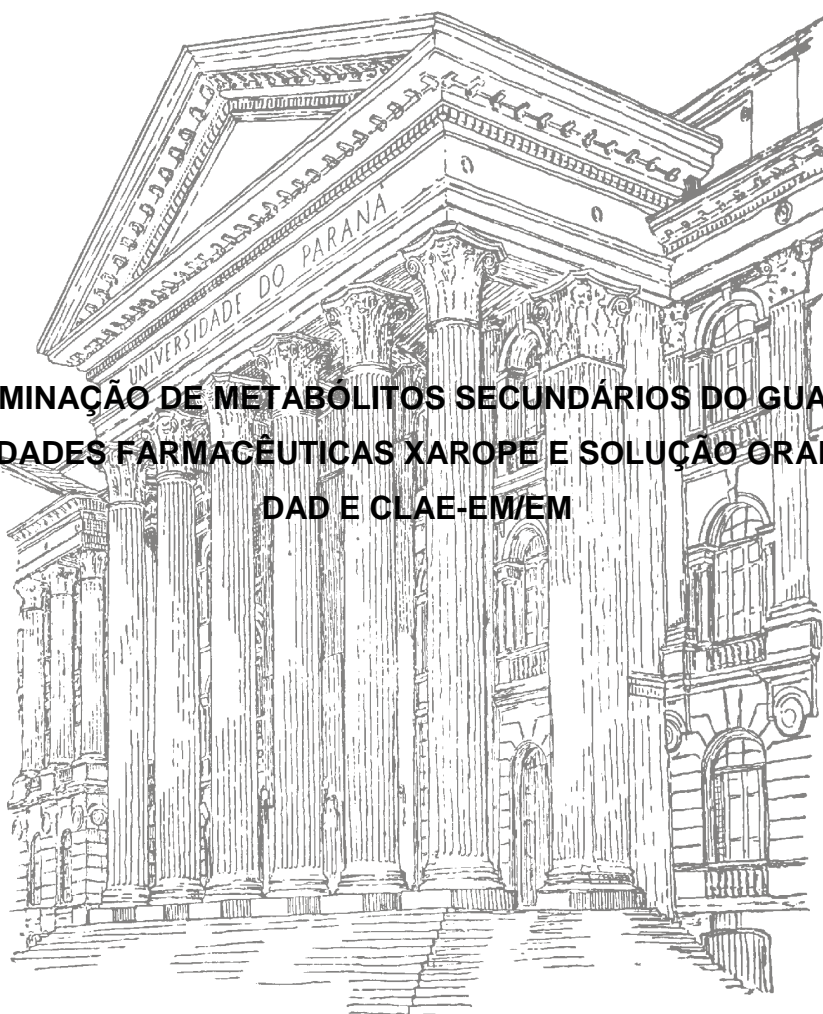


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOÃO CLEVERSON GASPARETTO

**DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO GUACO NAS
ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS XAROPE E SOLUÇÃO ORAL VIA CLAE-
DAD E CLAE-EM/EM**



CURITIBA

2010

JOÃO CLEVERSON GASPARETTO

**DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO GUACO NAS
ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS XAROPE E SOLUÇÃO ORAL VIA CLAE-
DAD E CLAE-EM/EM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

Co-orientador: Profa. Dra. Francinete Ramos Campos

CURITIBA

2010

À Rene Iolando Sanzovo,
A estrela que brilha forte guiando os passos desse alguém que muito lhe ama.

AGRADECIMENTOS

À agência de fomento à pesquisa CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante toda a Pós Graduação.

À Universidade Federal do Paraná por ter possibilitado meu desenvolvimento pessoal, profissional e intelectual durante esses 10 anos.

Ao meu amigo e orientador Prof. Dr. Roberto Pontarolo ao qual me acolheu, direcionou, aconselhou, apoiou e acreditou no meu desenvolvimento durante todos esses anos.

À minha amiga e co-orientadora Profa. Dra. Francinete Ramos Campos por toda a prestatividade, ensinamento e valiosa colaboração no meu progresso.

Aos preciosos amigos do Centro de Estudos em Biofarmácia da UFPR Thais Martins Guimarães de Francisco, Marco André Cardoso, Carlos Francisco Pedroso, Caroline Paola Uber, Bianca Sarturi Hess e Inajara Rotta por todo o carinho, parceria e espírito de equipe.

Aos professores Obdúlio Gomes Miguel, Alan Guilherme Gonçalves, Cassyano Januario Correr e Ângela Badaró Trindade que sempre me apoiaram e dedicaram parte do seu tempo para que chegasse até aqui.

À Dra. Lúcia Marina Rodrigues pelas oportunidades de crescimento pessoal durante uma das fases mais importantes da minha vida.

Ao Laboratório Herbarium que possibilitou a conclusão do trabalho fornecendo as matrizes de xarope e de solução oral.

À Profa. Maique Weber Biavatti (UFSC) pela prestatividade no fornecimento dos padrões analíticos de siringaldeído e ácido caurenóico, sendo estes de extrema relevância para nosso projeto.

Ao colegas de mestrado Bruno Vizzotto, Gustavo Bertol, Izabella Santos, Milena Kalegari e Simone Deo por toda a amizade, parceria e dedicação que tiveram comigo.

À minha família pelo incentivo e apoio dado durante toda minha vida.

RESUMO

No Brasil, as espécies de *Mikania glomerata* e *M. laevigata* (popularmente conhecidas como guaco), são amplamente utilizadas para o tratamento de diversas condições inflamatórias e alérgicas, principalmente as do sistema respiratório. Em virtude das propriedades farmacológicas atribuídas a essas espécies, os fitoterápicos a base de guaco tem seu uso amplamente difundido na população brasileira, sendo incluídos nos programas de fitoterapia do Sistema Único de Saúde (SUS). Apesar do reconhecimento terapêutico destes medicamentos, apenas três métodos analíticos foram encontrados na literatura para o controle de qualidade de especialidades farmacêuticas a base de guaco. Além destes métodos serem bastante laboriosos, pois envolvem diversas etapas de extração, avaliam somente a 1,2-benzopirona (cumarina), não sendo determinado nenhum outro metabólito relacionado aos efeitos farmacológicos do guaco. O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para quantificação de cinco metabólitos do guaco (cumarina, ácido o-cumárico, dihidrocumarina, siringaldeído e ácido caurenóico) através de CLAE-DAD e CLAE-EM/EM sem a necessidade de nenhum pré-tratamento das amostras. O método através de CLAE-DAD foi desenvolvido e validado em uma coluna Zorbax XDB C18 (150 x 4.6 mm, 5 μ m) utilizando como fase móvel uma mistura de água/metanol/acetonitrila/ácido fórmico (65:30:5:1, v/v/v/v), com fluxo de 1.0 mL min⁻¹ em modo isocrático de eluição. O volume de injeção foi de 20 μ L sendo os analitos monitorados em comprimento de onda único de 274 nm. Para todos os compostos, o método foi linear em um intervalo compreendido de 1.0 a 200 μ g mL⁻¹. O intervalo de recuperação para o ensaio de exatidão foi de 97.9 a 101.8% com um DPR < 5% para precisão intra-dia e inter-dia. O estudo de robustez indicou que o fluxo é um fator crítico. Os métodos através de CLAE-EM/EM foram desenvolvidos e validados em uma coluna XBridge C18 (150 x 2,1mm, 5 μ m) utilizando como fase móvel um gradiente de eluição entre água e acetonitrila contendo 0,05% de ácido fórmico ou 5 mM de formiato de amônio de acordo com as características de ionização de cada composto. O fluxo foi mantido em 200 μ L min⁻¹ no modo positivo de ionização e 220 mL min⁻¹ no modo negativo de ionização. Os métodos apresentaram linearidade nas faixas de 1,25 a 400 ng mL⁻¹ para cumarina, 10 a 600 ng mL⁻¹ para dihidrocumarina, 5 a 250 ng mL⁻¹ para o ácido caurenóico e 25 a 500 ng mL⁻¹ para siringaldeído e ácido o-cumárico. O intervalo de recuperação para o ensaio de exatidão foi de 95,3 a 103,8% com um DPR < 6,3% para precisão intra-dia e inter-dia. Os novos métodos podem ser aplicados para a quantificação destes metabólitos nas apresentações farmacêuticas xarope e solução oral, sendo, portanto, uma alternativa para o controle de qualidade deste tipo de produto na indústria farmacêutica.

Palavras chaves: Desenvolvimento analítico, validação de método, guaco, xarope de guaco, CLAE-DAD, CLAE-EM/EM.

ABSTRACT

Mikania glomerata and *M. laevigata* popularly known as guaco are widely used for the treatment of several inflammatory and allergic conditions, particularly in the respiratory system, probably acting through their bronchodilator and antiinflammatory properties. Due to therapeutic properties attributed to these species, guaco preparation has a widespread use in Brazilian population and it has been included in the government phytotherapy programs. Despite the widespread use, only three analytical methods were found in the literature for the quality control of guaco pharmaceutical preparations. Furthermore, these methods are very laborious (with several extraction processes required) and assess only 1,2 benzopyrone content (coumarin). Therefore do not quantify any other metabolites related to the pharmacological effects of guaco. The aim of this work is to development and validation of analytical methods to determine five guaco secondary metabolites (coumarin, *o*-coumaric acid, dihydrocoumarin, kaurenoic acid and syringaldehyde) by HPLC-DAD and HPLC-MS/MS without need any pretreatment of the samples. HPLC-DAD chromatographic separations were carried out on a Zorbax Eclipse XDB C₁₈ 150 x 4.6 mm i.d., 5- μ m particle size column. The mobile phase consisted of water/methanol/acetonitrile/formic acid (65:30:5:1, v/v/v/v) at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ in isocratic elution mode. The detection wavelength was set at 274 nm and the injection volume of the sample was 20 μ L. For all compounds, the method was linear, over a range of 1.0 - 200 μ g mL⁻¹. The range of recovery was 97.9 to 101.8% with a RSD < 5% for intra-day and inter-day precision. The robustness study indicated that flow rate is a critical factor. HPLC-MS/MS methods were carried out using Xbridge C₁₈ 150 x 2.1 mm i.d, 5 μ m particle size column. The mobile phase consisted in a gradient of water and acetonitrile containing 0.05% formic acid or 5 mM ammonium formate according the ionization characteristics of each analyte. The flow rates were 200 μ L min⁻¹ to the positive ionization mode and 220 μ L min⁻¹ to the negative ionization mode. The volume of injections was maintained 10 μ L in both methods. The methods showed linearity over a range of 1.25 to 400 ng mL⁻¹ for coumarin, 10 to 600 ng mL⁻¹ for dihydrocoumarin, 5 to 250 ng mL⁻¹ kaurenoic acid and 25 to 500 ng mL⁻¹ for syringaldehyde and *o*-coumaric acid. The range of recovery was 95.3 to 103.8% with a RSD < 6.3% for intra-day and inter-day precision. These methods are presented as an alternative for the quality control of pharmaceutical preparations containing guaco.

Key words: Analytical development, method validation, guaco, pharmaceutical preparations, liquid chromatograph, mass spectrometer.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ESQUEMA GERAL DE UM ANALISADOR DE MASSAS DO TIPO TRIPLO QUADRUPOLO.....	37
FIGURA 2	ESPECTRO DE VARREDURA NO UV DE UMA SOLUÇÃO ETANÓLICA DE CUMARINA.....	77
FIGURA 3	ESPECTRO DE VARREDURA NO UV DE UMA SOLUÇÃO ETANÓLICA DE ÁC. O-CUMÁRICO.....	78
FIGURA 4	ESPECTRO DE VARREDURA NO UV DE UMA SOLUÇÃO ETANÓLICA DE DIHIDROCUMARINA.....	78
FIGURA 5	ESPECTRO DE VARREDURA NO UV DE UMA SOLUÇÃO ETANÓLICA DE SIRINGALDEÍDO.....	78
FIGURA 6	ESPECTRO DE VARREDURA NO UV DE UMA SOLUÇÃO ETANÓLICA DE ÁC. CAURENÓICO.....	79
FIGURA 7	SOBREPOSIÇÃO DOS ESPECTROS DE VARREDURA NO UV DA CUMARINA, DA DIHIDROCUMARINA, DO ÁCIDO O-CUMÁRICO E DO SIRINGALDEÍDO.....	80
FIGURA 8	PERFIL CROMATOGRÁFICO DA SOLUÇÃO ORAL DE GUACO (AMOSTRA 1) UTILIZANDO DIFERENTES PROPORÇÕES DE ÁGUA E METANOL NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.....	82
FIGURA 9	PERFIL CROMATOGRÁFICO DA SOLUÇÃO ORAL DE GUACO (AMOSTRA 1) FORTIFICADA COM 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DE CUMARINA, ÁC. O-CUMÁRICO, DIHIDROCUMARINA E SIRINGALDEÍDO UTILIZANDO DIFERENTES PROPORÇÕES DE ÁGUA E METANOL NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL....	83
FIGURA 10	PERFIL CROMATOGRÁFICO DA SOLUÇÃO ORAL DE GUACO (AMOSTRA 1) FORTIFICADA COM 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DE CUMARINA, ÁC. O-CUMÁRICO, DIHIDROCUMARINA E SIRINGALDEÍDO UTILIZANDO DIFERENTES PROPORÇÕES DE ÁGUA, METANOL E ACETONITRILA NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.....	84
FIGURA 11	CROMATOGRAMAS OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-DAD UTILIZANDO DIFERENTES VAZÕES DE FLUXO.....	86
FIGURA 12	CROMATOGRAMAS DE UMA SOLUÇÃO ORAL DE GUACO FORTIFICADA OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-DAD EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	87
FIGURA 13	CROMATOGRAMA DE UMA SOLUÇÃO ORAL DE GUACO FORTIFICADA UTILIZADO PARA AVALIAÇÃO DA ADEQUABILIDADE DO MÉTODO.....	88
FIGURA 14	PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS PADRÕES DE CUMARINA, SIRINGALDEÍDO, ÁCIDO O-CUMÁRICO, DIHIDROCUMARINA E DAS AMOSTRAS DE TINTURA E EXTRATO CONCENTRADO DE GUACO.....	90

FIGURA 15	PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS PADRÕES DE METABÓLITOS DO GUACO E DE AMOSTRAS DE XAROPE E SOLUÇÃO ORAL DE GUACO DE DIFERENTES MARCAS OBTIDAS NO COMÉRCIO LOCAL DE CURITIBA-PR (AMOSTRAS 1 A 6).....	91
FIGURA 16	PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS PADRÕES DE METABÓLITOS DO GUACO E DE AMOSTRAS DE XAROPE E SOLUÇÃO ORAL DE GUACO DE DIFERENTES MARCAS OBTIDAS NO COMÉRCIO LOCAL DE CURITIBA-PR (AMOSTRAS 7 A 12).....	92
FIGURA 17	ESPECTRO DE CLAE-DAD DA MATRIZ DE XAROPE ISENTA DOS METABÓLITOS E DA MATRIZ FORTIFICADA COM PADRÕES ANALÍTICOS.....	94
FIGURA 18	ESPECTRO DE CLAE-DAD DA MATRIZ DE SOLUÇÃO ORAL ISENTA DOS METABÓLITOS E DA MATRIZ FORTIFICADA COM PADRÕES ANALÍTICOS.....	94
FIGURA 19	CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS ATRAVÉS DE CLAE-DAD PARA O ENSAIO DE SELETIVIDADE DA SOLUÇÃO ORAL DE GUACO.....	97
FIGURA 20	CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS ATRAVÉS DE CLAE-DAD PARA O ENSAIO DE SELETIVIDADE DO XAROPE DE GUACO.....	98
FIGURA 21	ESPECTROS DE ULTRAVIOLETA E CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE XAROPE DE GUACO FORTIFICADA OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-DAD PARA AVALIAÇÃO DA PUREZA CROMATOGRÁFICA DOS PICOS.....	100
FIGURA 22	ESPECTROS DE ULTRAVIOLETA E CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE SOLUÇÃO ORAL DE GUACO FORTIFICADA OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-DAD PARA AVALIAÇÃO DA PUREZA CROMATOGRÁFICA DOS PICOS.....	100
FIGURA 23	CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CUMARINA OBTIDA ATRAVÉS DE CLAE-DAD...	104
FIGURA 24	CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO O-CUMÁRICO OBTIDA ATRAVÉS DE CLAE-DAD.....	105
FIGURA 25	CURVA DE CALIBRAÇÃO DO SIRINGALDEÍDO OBTIDA ATRAVÉS DE CLAE-DAD.....	106
FIGURA 26	CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DIHIDROCUMARINA OBTIDA ATRAVÉS DE CLAE-DAD.....	107
FIGURA 27	CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE CUMARINA, ÁCIDO O-CUMÁRICO, DIHIDROCUMARINA E SIRINGALDEÍDO OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-DAD UTILIZANDO DIFERENTES LOTES E MARCAS DE COLUNAS.....	124
FIGURA 28	CROMATOGRAMAS DE UMA AMOSTRA DE SOLUÇÃO ORAL FORTIFICADA COM 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DE CUMARINA, ÁCIDO O-CUMÁRICO, DIHIDROCUMARINA E SIRINGALDEÍDO UTILIZANDO DIFERENTES LOTES E MARCAS DE COLUNAS.....	125
FIGURA 29	FULL SCAN DO PADRÃO DE CUMARINA UTILIZANDO ESI NO MODO POSITIVO DE IONIZAÇÃO.....	132

FIGURA 30	ÍONS FRAGMENTOS DA CUMARINA (m/z 147,1 Da) OBTIDOS ATRAVÉS DE MRM NO MODO POSITIVO DE IONIZAÇÃO.....	133
FIGURA 31	CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE CUMARINA, 6-METILCUMARINA E DIHIDROCUMARINA OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI+) UTILIZANDO COLUNA ZORBAX® NO DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO.....	136
FIGURA 32	CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE CUMARINA, 6-METILCUMARINA E DIHIDROCUMARINA OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI +) UTILIZANDO COLUNA ZORBAX® EM UMA VAZÃO DE FLUXO DE 800 $\mu\text{l min}^{-1}$	136
FIGURA 33	CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE CUMARINA, 6-METILCUMARINA E DIHIDROCUMARINA OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI+) UTILIZANDO COLUNA XBRIDGE® (150 X 4.6 mm) NO DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO.....	137
FIGURA 34	CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE CUMARINA, 6-METILCUMARINA E DIHIDROCUMARINA UTILIZANDO COLUNA XBRIDGE® (150 X 2.1 mm) NO DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO.....	138
FIGURA 35	CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE CUMARINA, 6-METILCUMARINA E DIHIDROCUMARINA OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI+) UTILIZANDO DIFERENTES VAZÕES DE FLUXO.....	139
FIGURA 36	CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE ÁCIDO BENZÓICO, ÁCIDO CAURENÓICO, ÁCIDO O-CUMÁRICO E SIRINGALDEÍDO OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO MODO ISOCRÁTICO DE ELUIÇÃO.....	141
FIGURA 37	CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE ÁCIDO BENZÓICO, ÁCIDO CAURENÓICO, ÁCIDO O-CUMÁRICO E SIRINGALDEÍDO OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO MODO DE ELUIÇÃO GRADIENTE.....	142
FIGURA 38	CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE XAROPE DE GUACO FORTIFICADA COM ÁCIDO BENZÓICO OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI-)	143
FIGURA 39	CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE XAROPE DE GUACO FORTIFICADA COM PREDNISONA OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI -).....	144
FIGURA 40	CROMATOGRAMA DA PREDNISONA, ÁCIDO CAURENÓICO, ÁCIDO O-CUMÁRICO E SIRINGALDEÍDO OBTIDO APÓS AS OTIMIZAÇÕES DO MÉTODO (ESI-).....	144
FIGURA 41	CROMATOGRAMA DA MATRIZ DE XAROPE (A), DA MATRIZ DE SOLUÇÃO ORAL (B) E DOS PADRÕES DE CUMARINA, 6-METILCUMARINA E DIHIDROCUMARINA OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI+).....	146
FIGURA 42	CROMATOGRAMA DA MATRIZ DE XAROPE (A), DA MATRIZ DE SOLUÇÃO ORAL (B) E DOS PADRÕES DE ÁCIDO O-CUMÁRICO, SIRINGALDEÍDO, ÁCIDO CAURENÓICO E PREDNISONA (C) OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI-).....	147

FIGURA 43	GRÁFICO DA LINEARIDADE DA CUMARINA OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM.....	152
FIGURA 44	GRÁFICO DA LINEARIDADE DA DIHIDROCUMARINA OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM.....	152
FIGURA 45	GRÁFICO DA LINEARIDADE DO ÁCIDO O-CUMÁRICO OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM.....	153
FIGURA 46	GRÁFICO DA LINEARIDADE DO ÁCIDO CAURENÓICO OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM.....	153
FIGURA 47	GRÁFICO DA LINEARIDADE DO SIRINGALDEIDO OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM.....	154

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	ESQUEMA DE DILUIÇÃO PARA O PREPARO DAS SOLUÇÕES DE CUMARINA, ÁC. O-CUMÁRICO, DIHIDROCUAMARINA E SIRINGALDEÍDO PARA O ESTUDO DO LIMITE DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO EM CLAE-DAD.....	57
TABELA 2	ESQUEMA DE DILUIÇÃO PARA O PREPARO DAS SOLUÇÕES DOS METABÓLITOS DO GUACO PARA O ENSAIO DE LINEARIDADE EM CLAE-DAD.....	58
TABELA 3	PREPARO DAS AMOSTRAS DE XAROPE E DE SOLUÇÃO ORAL DE GUACO PARA DETERMINAÇÃO DA CUMARINA E DA DIHIDROCUMARINA ATRAVÉS DE CLAE- EM/EM (ESI+).....	62
TABELA 4	PREPARO DAS AMOSTRAS DE XAROPE E DE SOLUÇÃO ORAL DE GUACO PARA DETERMINAÇÃO DO ÁC. O-CUMÁRICO, ÁC. CAURENÓICO E SIRINGALDEÍDO ATRAVÉS DE CLAE- EM/EM (ESI-).....	63
TABELA 5	ESQUEMA PARA O PREPARO DAS SOLUÇÕES DE CUMARINA, ÁCIDO O-CUMÁRICO, ÁCIDO CAURENÓICO, DIHIDROCUMARINA E SIRINGALDEÍDO PARA ESTUDO DO LIMITE DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO EM CLAE-EM/EM.....	67
TABELA 6	ESQUEMA DE DILUIÇÃO PARA O PREPARO DAS SOLUÇÕES DOS METABÓLITOS DO GUACO PARA O ENSAIO DE LINEARIDADE EM CLAE-EM/EM (ESI+).....	69
TABELA 7	ESQUEMA DE DILUIÇÃO PARA O PREPARO DAS SOLUÇÕES DOS METABÓLITOS DO GUACO PARA O ENSAIO DE LINEARIDADE EM CLAE-EM/EM (ESI-).....	69
TABELA 8	NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO UTILIZADOS PARA O ENSAIO DE PRECISÃO...	70
TABELA 9	PREPARO DA AMOSTRA DE SOLUÇÃO ORAL COM DIFERENTES NÍVEIS DE FORTIFICAÇÃO PARA OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EXPERIMENTAL PARA O ENSAIO DE EXATIDÃO (ESI+).....	72
TABELA 10	PREPARO DA AMOSTRA DE SOLUÇÃO ORAL COM DIFERENTES NÍVEIS DE FORTIFICAÇÃO PARA OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EXPERIMENTAL PARA O ENSAIO DE EXATIDÃO (ESI-).....	72
TABELA 11	PARÂMETROS AVALIADOS PARA VERIFICAÇÃO DA ADEQUABILIDADE DO MÉTODO DE CLAE-DAD.....	88
TABELA 12	ÁREAS OBTIDAS DE CADA ANALITO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES PARA SOLUÇÕES DA AMOSTRA DE SOLUÇÃO ORAL FORTIFICADA COM OS METABÓLITOS DO GUACO E PARA AS SOLUÇÕES DE PADRÕES.....	95
TABELA 13	ÁREAS OBTIDAS DE CADA ANALITO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES PARA SOLUÇÕES DA AMOSTRA DE XAROPE FORTIFICADA COM OS METABÓLITOS DO GUACO E PARA AS SOLUÇÕES DE PADRÕES.....	96

TABELA 14	COEFICIENTES ANGULARES OBTIDOS A PARTIR DE CURVAS ANALÍTICAS DE SOLUÇÕES PADRÃO E DAS AMOSTRAS DE XAROPE E DE SOLUÇÃO ORAL DE GUACO FORTIFICADAS PARA AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE.....	99
TABELA 15	LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS PADRÕES DE CUMARINA, ÁCIDO O-CUMÁRICO, SIRINGALDEÍDO E DIHIDROCUMARINA.....	101
TABELA 16	ÁREAS DOS PICOS DOS PADRÕES DOS METABÓLITOS EM ESTUDO OBTIDAS ATRAVÉS DE CLAE-DAD PARA A CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	102
TABELA 17	ÁREAS DOS PICOS DOS METABÓLITOS EM ESTUDO OBTIDAS ATRAVÉS DE CLAE-DAD PARA DETERMINAÇÃO DA REPETIBILIDADE.....	110
TABELA 18	ÁREAS DOS PICOS DOS METABÓLITOS EM ESTUDO OBTIDAS ATRAVÉS DE CLAE-DAD PARA DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.....	111
TABELA 19	CONCENTRAÇÃO DOS METABÓLITOS PRESENTES EM UMA MATRIZ DE SOLUÇÃO ORAL DE GUACO PARA O ENSAIO DE EXATIDÃO EM CLAE-DAD.	112
TABELA 20	DADOS DA RECUPERAÇÃO DOS METABÓLITOS EM ESTUDO PARA ENSAIO DE EXATIDÃO EM CLAE-DAD UTILIZANDO O MÉTODO DA ADIÇÃO DO PADRÃO.....	113
TABELA 21	FATORES DE CAUDA DETERMINADOS A PARTIR DOS CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE METABÓLITOS EM ESTUDO VARIANDO FASE MÓVEL, TEMPERATURA E FLUXO.....	116
TABELA 22	RESOLUÇÕES OBTIDAS A PARTIR DOS CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE METABÓLITOS EM ESTUDO VARIANDO FASE MÓVEL, TEMPERATURA E FLUXO.....	117
TABELA 23	DADOS DA RECUPERAÇÃO DA CUMARINA VARIANDO FASE MÓVEL, TEMPERATURA E FLUXO PARA ENSAIO DE ROBUSTEZ.....	118
TABELA 24	DADOS DA RECUPERAÇÃO DO ÁCIDO O-CUMÁRICO VARIANDO FASE MÓVEL, TEMPERATURA E FLUXO PARA ENSAIO DE ROBUSTEZ.....	119
TABELA 25	DADOS DA RECUPERAÇÃO DA DIHIDROCUMARINA VARIANDO FASE MÓVEL, TEMPERATURA E FLUXO PARA ENSAIO DE ROBUSTEZ.....	120
TABELA 26	DADOS DA RECUPERAÇÃO DO SIRINGALDEÍDO VARIANDO FASE MÓVEL, TEMPERATURA E FLUXO PARA ENSAIO DE ROBUSTEZ.....	121
TABELA 27	TEOR DE CUMARINA, ÁCIDO O-CUMÁRICO, DIHIDROCUMARINA E SIRINGALDEÍDO OBTIDOS NA TINTURA E NO EXTRATO GUACO ATRAVÉS DE CLAE-DAD.....	128
TABELA 28	TEOR DE CUMARINA, ÁCIDO O-CUMÁRICO, DIHIDROCUMARINA E SIRINGALDEÍDO OBTIDOS NAS ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS ATRAVÉS DE CLAE-DAD.....	128
TABELA 29	TEOR DE CUMARINA DECLARADO E O ENCONTRADO NO DOSEAMENTO DAS ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS POR CLAE-DAD.....	129

TABELA 30	RESULTADOS DOS LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CUMARINA, ÁCIDO O-CUMÁRICO, ÁCIDO CAURENÓICO, SIRINGALDEÍDO E DIHIDROCUMARINA EM CLAE-EM/EM.....	148
TABELA 31	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS NO ESTUDO DA LINEARIDADE DO MÉTODO DE CLAE-EM/EM (ESI+).....	150
TABELA 32	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS NO ESTUDO DA LINEARIDADE DO MÉTODO DE CLAE-EM/EM (ESI-).....	151
TABELA 33	COEFICIENTES DE VARIAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DAS ÁREAS NO ENSAIO DE REPETIBILIDADE ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM.....	156
TABELA 34	COEFICIENTES DE VARIAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DAS ÁREAS NO ENSAIO DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM.....	157
TABELA 35	RESULTADOS DO ENSAIO DE EXATIDÃO EM CLAE-EM/EM UTILIZANDO O MÉTODO DA ADIÇÃO DO PADRÃO.....	159
TABELA 36	RESULTADO DO ENSAIO DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE TRABALHO.....	161
TABELA 37	TEOR DOS METABÓLITOS EM ESTUDO OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM NAS ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS XAROPE E SOLUÇÃO ORAL DE GUACO.....	162
TABELA 38	COMPARATIVO ENTRE OS RESULTADOS DE TEOR DE CUMARINA E ÁCIDO O-CUMÁRICO OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-DAD E CLAE-EM/EM....	164

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	DESCRIÇÃO DO REGISTRO, COMPOSIÇÃO E TEOR DE ATIVO DECLARADO NAS FORMAS FARMACÊUTICAS OBTIDAS NO COMÉRCIO LOCAL DE CURITIBA-PR.....	48
QUADRO 2	ESTRUTURA MOLECULAR, TEOR E ORIGEM DOS PADRÕES ANALÍTICOS UTILIZADOS NO ESTUDO.....	49
QUADRO 3	ESTRUTURA MOLECULAR, TEOR E ORIGEM DOS PADRÕES INTERNOS UTILIZADOS PARA ANÁLISES EM CLAE-EM/EM.....	50
QUADRO 4	GRADIENTE UTILIZADO EM CLAE-EM/EM PARA QUANTIFICAÇÃO DA CUMARINA E DA DIHIDROCUMARINA.....	74
QUADRO 5	PARÂMETROS OTIMIZADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA DETERMINAÇÃO DA CUMARINA E DA DIHIDROCUMARINA.....	74
QUADRO 6	GRADIENTE UTILIZADO EM CLAE-EM/EM PARA QUANTIFICAÇÃO DO ÁC. O-CUMARICO, ÁCIDO CAURENÓICO E SIRINGALDEÍDO.....	75
QUADRO 7	PARÂMETROS OTIMIZADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO O-CUMÁRICO, SIRINGALDEÍDO E ÁCIDO CAURENÓICO.....	76
QUADRO 8	PROPRIEDADES DOS SOLVENTES UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO.....	84
QUADRO 9	PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DAS COLUNAS UTILIZADAS PARA O ENSAIO DE ROBUSTEZ.....	126
QUADRO 10	PARÂMETROS OTIMIZADOS ATRAVÉS DE MRM PARA OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS MAIS INTENSOS DA CUMARINA, DIHIDROCUMARINA E 6-METILCUMARINA.....	133
QUADRO 11	PARÂMETROS OTIMIZADOS ATRAVÉS DE MRM PARA OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS MAIS INTENSOS DO ÁCIDO O-CUMÁRICO, ÁCIDO CAURENÓICO, SIRINGALDEÍDO E PREDNISONA.....	134
QUADRO 12	PARÂMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO OTIMIZADOS ATRAVÉS DE ANÁLISES POR INJEÇÃO EM FLUXO.....	134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	- Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	- Análise de variância
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	- <i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>
CAD	- <i>Collision gas</i>
CBPFC	- Certificação de boas práticas de fabricação e controle
CE	- <i>Collision energy</i>
CEP	- <i>Collision cell entrance potencial</i>
CG	- Cromatografia gasosa
CG-DIC	- Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama
CG-EM	- Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM/EM	- CLAE acoplado a espectrometria de massas e recursos <i>Tandem</i>
CLAE-DAD	- Cromatógrafo líquido com detector de arranjo de diodos
COX2	- Ciclooxigenase
cps	- Contagens / segundo
CUR	- <i>Curtain gas</i>
CV	- Coeficiente de variação
CXP	- <i>Cell exit potencial</i>
DAD	- Detector de arranjo de diodos
DDR	- Dose diária recomendada
DP	- Desvio Padrão
DP*	- <i>Declustering Potencial</i>
EM	- Espectrômetro de massas
EP	- <i>Entrance potencial</i>
ESI	- <i>Electrospray</i>
FIA	- Análise por injeção em fluxo
FDA	- Food and Drug Administration
GS1	- <i>Nebulizer gas</i>
GS2	- <i>Turbo gas</i>
ICH	- International Conference on Harmonisation
ICR	- <i>Ion cyclotron resonance</i>
INMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia
IS	- <i>Ion spray voltage</i>

IUPAC	- International Union of Pure and Applied Chemistry
K'	- Fator de retenção
LD	- Limite de detecção
LQ	- Limite de quantificação
LTQ-FTICR-MS	- <i>Linear Triple Quadrupole Ion-trap and Fourier-transform Ion-cyclotron-resonance Mass Spectrometry</i>
m/z	- massa/carga
MALDI	- Matriz assistida por dessorção / ionização a laser
MAO-A	- Monoamino oxidase A
MAO-B	- Monoamino oxidase B
MI	- <i>Multiple ions</i>
MRM	- <i>Multiple Reaction Monitoring</i>
$[M+H]^+$	- Massa molecular mais um hidrogênio
$[M-H]^-$	- Massa molecular menos um hidrogênio
n	- Número de amostras
N	- Número de pratos teóricos
ODS	- Octadecilsilano
PNPIC	- Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PTFE	- Politetrafluoretileno
PVDF	- Fluoreto de polivinilideno
Q	- Quadrupolo
r	- Coeficiente de correlação de Pearson
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
RE	- Resolução
RENAME	- Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
rpm	- Rotações por minuto
Rs	- Resolução
SPE	- <i>Solid phase extraction</i>
SUS	- Sistema Único de Saúde
TOF	- <i>Time of Fly</i>
T	- Fator de cauda
T_0	- Tempo morto
T_r	- Tempo de retenção
USP	- <i>The United States Pharmacopeial Convention</i>
UV	- Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 OBJETIVO GERAL	22
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 FITOTERAPIA	23
2.1.1 Fitoterapia no Brasil	25
2.2 <i>Mikania laevigata</i> e <i>M. glomerata</i> – Uma revisão	27
2.2.1 Controle de qualidade de fitoterápicos a base de guaco	28
2.2.2 Metabólitos majoritários dos extratos medicinais de guaco	28
2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	30
2.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS	32
2.5 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	37
2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS	38
2.6.1 Parâmetros para validação de métodos analíticos	39
2.6.1.1 Especificidade e Seletividade	39
2.6.1.2 Limite de detecção (LD)	40
2.6.1.3 Limite de quantificação (LQ)	41
2.6.1.4 Linearidade e curva de calibração	42
2.6.1.5 Intervalo	43
2.6.1.6 Precisão	43
2.6.1.6.1 Repetibilidade	44
2.6.1.6.2 Precisão intermediária	44
2.6.1.6.3 Reprodutibilidade	45
2.6.1.7 Exatidão	45
2.6.1.8 Robustez	46
3 MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE GUACO	48
3.2 OBTENÇÃO DOS PADRÕES ANALÍTICOS	49

3.3 OBTENÇÃO DAS MATRIZES DE XAROPE E DE SOLUÇÃO ORAL ISENTAS DOS METABÓLITOS DE INTERESSE.....	50
3.4 REAGENTES E SOLVENTES.....	51
3.5 ANÁLISES ATRAVÉS DE CLAE-DAD.....	51
3.5.1 Preparo dos padrões.....	51
3.5.2 Análise dos padrões através de espectroscopia de ultravioleta.....	52
3.5.3 Preparo das amostras comerciais de xarope e de solução oral de guaco....	52
3.5.4 Preparo das amostras de tintura e extrato concentrado de guaco.....	53
3.5.5 Instrumentação.....	53
3.5.6 Desenvolvimento do método.....	53
3.5.7 Determinação do teor dos metabólitos secundários do guaco nas amostras de xarope e solução oral.....	54
3.5.8 Validação do método analítico de CLAE-DAD.....	55
3.5.8.1 Seletividade.....	55
3.5.8.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	57
3.5.8.3 Linearidade e intervalo de trabalho.....	57
3.5.8.4 Precisão.....	58
3.5.8.5 Exatidão.....	59
3.5.8.6 Robustez.....	60
3.6 ANÁLISES POR CLAE-EM/EM.....	61
3.6.1 Preparo das soluções diluentes.....	61
3.6.2 Preparo dos padrões.....	61
3.6.3 Preparo das amostras comerciais de xarope e de solução oral de guaco....	62
3.6.4 Instrumentação.....	63
3.6.5 Desenvolvimento do método.....	64
3.6.5.1 Infusão direta no EM para checagem do sinal dos analitos.....	64
3.6.5.2 Análise por injeção em fluxo (FIA).....	64
3.6.5.3 Análise por CLAE-EM/EM.....	65
3.6.6 Validação dos métodos de CLAE-EM/EM.....	65
3.6.6.1 Seletividade.....	66
3.6.6.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	67
3.6.6.3 Linearidade e intervalo.....	68
3.6.6.4 Precisão.....	70

3.6.6.5 Exatidão.....	71
3.6.6.6 Teste de estabilidade das soluções padrão.....	72
3.6.7 Determinação via CLAE-EM/EM dos metabólitos secundários do guaco nas amostras de xarope e solução oral.....	73
3.6.7.1 Modo de ionização positivo.....	73
3.6.7.2 Modo de ionização negativo.....	75
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
4.1 ANÁLISES ATRAVÉS DE CLAE-DAD.....	77
4.1.1 Espectroscopia de ultravioleta.....	77
4.1.2 Desenvolvimento do método.....	80
4.1.2.1 Escolha da coluna.....	80
4.1.2.2 Composição da fase móvel.....	81
4.1.2.3 Fluxo.....	85
4.1.2.4 Temperatura.....	86
4.1.3 Avaliação do método.....	87
4.1.4 Aplicabilidade do método.....	90
4.1.5 Validação do método de CLAE-DAD.....	93
4.1.5.1 Seletividade.....	93
4.1.5.1.1 Método da comparação da matriz.....	93
4.1.5.1.2 Método da adição do padrão.....	95
4.1.5.1.3 Avaliação da seletividade através de detector de arranjo de diodo.....	99
4.1.5.2 Limite de detecção e limite de quantificação.....	101
4.1.5.3 Linearidade e intervalo.....	102
4.1.5.3.1 Linearidade.....	102
4.1.5.3.2 Intervalo de trabalho.....	109
4.1.6 Precisão.....	110
4.1.6.1 Repetibilidade.....	110
4.1.6.2 Precisão intermediária.....	111
4.1.7 Exatidão.....	112
4.1.8 Robustez.....	114
4.1.9 Determinação do teor dos metabólitos em estudos nas amostras comerciais de xarope, soluções orais, extrato e tintura de guaco.....	127
4.2 ANÁLISES ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM.....	130

4.2.1 Desenvolvimento do método.....	131
4.2.1.1 Otimização dos analitos.....	131
4.2.1.2 Análises por CLAE-EM/EM.....	135
4.2.1.2.1 Modo positivo de ionização.....	135
4.2.1.2.2 Modo negativo de ionização.....	140
4.2.2 Validação dos métodos de CLAE-EM/EM.....	145
4.2.2.1 Seletividade.....	145
4.2.2.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	148
4.2.2.3 Linearidade e intervalo.....	149
4.2.2.3.1 Linearidade.....	149
4.2.2.3.2 Intervalo de trabalho.....	155
4.2.2.4 Precisão.....	155
4.2.2.4.1 Repetibilidade.....	155
4.2.2.4.2 Precisão intermediária.....	157
4.2.2.5 Exatidão.....	158
4.2.2.6 Estabilidade.....	160
4.2.3 Determinação via CLAE-EM/EM dos metabólitos secundários do guaco nas amostras de xarope e solução oral.....	162
4.3 COMPARATIVO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS EM CLAE-DAD E CLAE-EM/EM.....	163
4.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS MÉTODOS DESENVOLVIDOS.....	165
5 CONCLUSÃO.....	167
REFERÊNCIAS.....	169
ANEXO 1	182
ANEXO 2	219

1 INTRODUÇÃO

Ao longo da história, os produtos naturais têm sido utilizados com sucesso na prevenção e cura de diversos tipos de enfermidades. Por um longo período de tempo, estes contribuíram com os cuidados primários de saúde sendo considerados como a principal fonte de recursos na descoberta de novas drogas (RATES 2001; RASKIN *et al.*, 2002).

Com o passar dos anos, a ascensão da indústria farmacêutica no século XX fez com que as pesquisas por produtos naturais declinassem, substituindo os extratos medicinais por moléculas sintéticas, as quais passaram a triunfar no tratamento de doenças (RASKIN *et al.*, 2002). Entretanto, após um longo período de êxito, a medicina convencional demonstrou algumas limitações como ineficácia terapêutica e a dificuldade de desenvolvimento de produtos mais efetivos. Em virtude disso, no mundo todo o interesse por produtos naturais se restabeleceu (RATES, 2001).

Em décadas mais recentes, o uso das terapias alternativas tem aumentado consideravelmente, especialmente por produtos naturais derivados de plantas. As principais razões para o crescimento do consumo estão na acessibilidade, baixo custo e ao baixo efeito colateral quando comparados a medicamentos convencionais (RATES, 2001, RASKIN *et al.*, 2002).

Dentre as diversas plantas medicinais utilizadas no Brasil, as espécies *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*, popularmente conhecidas como guaco, são amplamente utilizadas, com evidências pré-clínicas para o tratamento de problemas respiratórios em que sejam benéficas as ações broncodilatadora, anti-inflamatória e anti-espasmódica (NEVES; SÁ, 1991; BIGUETTI, 1999). Devido às propriedades terapêuticas atribuídas a essas espécies, as folhas de *M. glomerata* foram estabelecidas na primeira edição da Farmacopéia Brasileira, enquanto que *M. laevigata* teve sua monografia incluída na quinta edição (BRASIL, 1929; 2005).

Os medicamentos fitoterápicos a base de guaco vem sendo utilizados em larga escala na rede de saúde pública (SUS), através da implantação de programas de fitoterapia em vários municípios nos estados brasileiros (BRASIL, 2006a; SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PRÁTICAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES EM SAÚDE, 2008). Em virtude disto, o xarope e a solução

oral de *Mikania glomerata* Spreng. foram incluídos no elenco de referência de medicamentos e insumos complementares para a assistência farmacêutica na atenção básica em saúde, conforme anexo II da portaria nº 3.237 de 24 de dezembro de 2007 (BRASIL, 2007).

De acordo com a instrução normativa nº 5 de 11 de dezembro de 2004, que determina a lista de registro simplificado de fitoterápicos no Brasil, é considerado o marcador químico do guaco a cumarina simples (1,2 benzopirona). No entanto, embora muitos autores atribuam o efeito farmacológico do guaco a este marcador, pesquisas recentes demonstraram que existe sinergismo entre metabólitos presentes nos extratos medicinais, incluindo o precursor da cumarina, o ácido o-cumárico (ABOY *et al.*, 2002; SUYENAGA *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2006). Adicionalmente, outros metabólitos tais como dihidrocumarina, ácido caurenóico e siringaldeído, também são descritos como majoritários, contribuindo provavelmente para os efeitos benéficos do guaco (FIERRO *et al.*, 1999; PEDROSO *et al.*, 2008).

Na literatura, diversos métodos analíticos são relatados para a determinação da cumarina nos extratos medicinais de guaco (VILEGAS; DEMARCHI; LANCAS, 1997a; CELEGHINI; VILEGAS; LANCAS, 2001; OSORIO, 2004; SANTOS *et al.*, 2006). No entanto, para formas farmacêuticas existem apenas três relatos envolvendo controle de qualidade destes medicamentos (SANTOS *et al.*, 2006; ROCHA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008). Além de os métodos utilizados serem muito laboriosos, pois exigem várias etapas de extração, determinam somente a cumarina, não sendo determinado, portanto nenhum outro metabólito relacionado ao efeito terapêutico.

Desta forma, este trabalho visou o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para quantificação dos metabólitos secundários do guaco (cumarina, ácido o-cumárico, dihidrocumarina, ácido caurenóico e siringaldeído) em formas farmacêuticas xarope e solução oral através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – DAD e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas e Recursos *Tandem*. O presente trabalho é apresentado como uma alternativa para o controle de qualidade nestes tipos de produtos.

1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar métodos analíticos através de CLAE-DAD e CLAE-EM/EM para quantificação de metabólitos secundários do guaco (cumarina, ácido *o*-cumárico, dihidrocumarina, ácido caurenóico e siringaldeído) nas especialidades farmacêutica xarope e solução oral.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Otimizar parâmetros cromatográficos em CLAE-DAD levando em consideração gasto com fase móvel, qualidade do cromatograma e tempo de corrida.

Validar o método de CLAE-DAD através de norma vigente nacional (ANVISA) e internacional (ICH).

Quantificar através de CLAE-DAD os metabólitos secundários do guaco (1,2-benzopirona, ácido *o*-cumárico, ácido caurenóico, siringaldeído e dihidrocumarina) em diferentes amostras de xarope e solução oral de guaco disponíveis no comércio local de Curitiba.

Otimizar parâmetros cromatográficos e do espectrômetro de massas levando em consideração sensibilidade, gasto com fase móvel, qualidade do cromatograma e tempo de corrida.

Validar os métodos de CLAE-EM/EM através de norma vigente nacional (ANVISA) e internacional (ICH).

Quantificar através de CLAE-EM/EM os metabólitos secundários do guaco (1,2-benzopirona, ácido *o*-cumárico, ácido caurenóico, siringaldeído e dihidrocumarina) em diferentes amostras de xarope e solução oral de guaco disponíveis no comércio local de Curitiba.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FITOTERAPIA

Plantas medicinais têm sido a base dos principais produtos indicados para a saúde desde a antigüidade (RASKIN *et al.*, 2002; BRASIL, 2006a; SCHMIDT *et al.*, 2008). Historicamente, foram utilizadas com sucesso para a cura e prevenção de doenças até o ano de 1897, quando Friedrich Bayer introduziu no mundo o primeiro medicamento sintético, o ácido acetilsalicílico. A partir de então, com a revolução industrial e com o desenvolvimento da química orgânica, o século XX foi marcado pelo triunfo das indústrias farmacêuticas de medicamentos alopáticos, as quais substituíram os extratos naturais por moléculas sintéticas. As razões para esse grande êxito eram substanciais, pois, moléculas sintéticas são facilmente obtidas, e, além disso, de possível modificação estrutural, o que potencializa sua atividade, torna o medicamento mais seguro e economicamente interessante para a indústria farmacêutica (RASKIN *et al.*, 2002; RATES, 2001).

Com o passar dos anos, a medicina convencional demonstrou certas limitações como, por exemplo, altos índices de efeitos colaterais, ineficácia terapêutica e a dificuldade de desenvolvimento de produtos mais efetivos. A partir de então novamente o interesse pelos produtos fitoterápicos se restabeleceu, especialmente por produtos a base de plantas medicinais, os quais nos últimos anos tiveram seu consumo aumentado especialmente pelo baixo custo, fácil acesso, e os mínimos efeitos colaterais quando comparados a formulações convencionais (RATES, 2001; RASKIN *et al.*, 2002; (OMS, 2002).

A aceitação da visão holística para o tratamento de doenças também contribuiu para o aumento do consumo das plantas medicinais e seus fitoterápicos. O paradigma do século XX de que doenças são tratadas com uma única molécula foi quebrado com a aceitação de que doenças complexas possuem natureza multifatorial e são melhores tratadas com complexos botânicos, sendo possível o ajuste de dose de acordo com a fase em que o paciente se encontra (RASKIN *et al.*, 2002). Adicionalmente, uma maior compreensão de micronutrientes disponíveis em dietas suplementares, bem como a identificação de novos metabólitos, corroboraram

para que o retorno da pesquisa e do desenvolvimento de componentes bioativos se restabelecesse. Dessa forma, os laços entre o uso de plantas medicinais e a saúde não estão relacionados somente ao tratamento de doenças ou alimentação, mas também como grande importância no processo de descoberta de novas drogas (RASKIN *et al.*, 2002; HARVEY, 2008; RISHTON, 2008; SCHMIDT *et al.*, 2008). Plantas, além de tudo, possuem uma valiosa fonte de recurso terapêutico devido a sua vasta capacidade biosintética constituída por uma coleção de compostos relacionados com múltiplas atividades que interagem para um efeito sinérgico e uma maior efetividade (RASKIN *et al.*, 2002; SCHMIDT *et al.*, 2008).

Por esses vários motivos, o mercado mundial da medicina praticada com plantas medicinais já está estimado em 60 milhões de dólares por ano sendo que os gastos públicos e privados claramente vêm aumentando, apesar de ainda escassos (OMS, 2002). Países da América Latina, China, Índia, França, Alemanha e Estados Unidos têm investido em programas de pesquisas, padronização e regulamentação de plantas medicinais e seus derivados (RATES, 2001). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam que hoje, aproximadamente 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam a medicina tradicional para os cuidados primários de saúde, e que em torno de 85% desta, envolve o uso de plantas medicinais, seus extratos vegetais e seus princípios ativos (OMS, 2002).

Cabe lembrar sobre a importância do retorno às pesquisas com produtos naturais, que as mais importantes e impactantes drogas são derivadas de plantas medicinais, como por exemplo, a vincristina, a vinblastina e o taxol utilizados clinicamente contra alguns tipos de câncer (RASKIN *et al.*, 2002; ZHIGALTSEV *et al.*, 2005; HARVEY, 2008).

Contudo, para que o aumento da divulgação e a diminuição da resistência ao uso de medicamentos fitoterápicos sejam efetivos, se torna crucial garantir segurança, eficácia e qualidade destes produtos. Para tanto, monoculturas geneticamente uniformizadas que assegurem uma composição química padronizada, normas e legislações, sistemas nacionais de inspeção e controle de efeitos adversos, proposições de protocolos pré-clínicos e clínicos bem como o uso racional dessas drogas, farão novamente com que compostos naturais tornem-se centrais para o tratamento e a compreensão dos mecanismos das doenças (BRASIL, 2001; OMS, 2002; RASKIN *et al.*, 2002; SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002; HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003; RISHTON, 2008).

2.1.1 Fitoterapia no Brasil

A pesquisa de novos metabólitos oriundos de plantas é de fundamental importância no desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de doenças, especialmente aquelas negligenciadas como tuberculose, malária, mal de chagas, esquistossomose, leishmaniose e doença do sono. Essas doenças afetam principalmente países em desenvolvimento, e pouco interessa a indústria farmacêutica, pois embora esses países reúnam 80% da população mundial, correspondem a apenas a 20% das vendas globais de medicamentos (FUNARI; FERRO, 2005).

O Brasil vem se destacando no cenário internacional por possuir potencial necessário para o desenvolvimento de pesquisas que resultem em novas tecnologias e serviços terapêuticos. Isso porque, o país detém um valioso conhecimento tradicional relacionado ao uso de plantas medicinais, possui uma rica diversidade étnica e cultural, e ainda, é o país de maior biodiversidade do planeta (BRASIL, 2006a).

O incentivo e a adesão de vários municípios brasileiros aos programas de terapia alternativa e complementar fez com que o aumento de interesse por produtos fitoterápicos se concretizasse em todo o país. Entretanto, ao mesmo passo em que os estímulos aos programas são concedidos, novas legislações vêm sendo discutidas e criadas de forma a cumprir com as diretrizes nacionais e internacionais sobre efeito terapêutico, acesso seguro e uso racional destes medicamentos (SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002; BRASIL, 2006a; 2006b; SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PRÁTICAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES EM SAÚDE, 2008). De forma a atender a essas diretrizes, em fevereiro de 2000, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA) deu seu primeiro passo regulamentando o registro de fitoterápicos no país, e desde então, a indústria farmacêutica vem se adequando as novas regras de forma a garantir eficácia, qualidade e segurança desses medicamentos (BRASIL, 2000a).

No ano de 2001, o Ministério da Saúde em seu Programa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos (CEME) objetivou com embasamento científico, o desenvolvimento de uma terapêutica alternativa e complementar, estabelecendo o real valor farmacológico de preparações de uso popular à base de

plantas medicinais. Sua estratégia era submeter às preparações a uma bateria completa de testes farmacológicos, toxicológicos, pré-clínicos e clínicos confirmando ou não as propriedades terapêuticas atribuídas a estes medicamentos. Os fitoterápicos que confirmassem eficácia terapêutica e ausência de efeitos prejudiciais seriam integrados à Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – RENAME (BRASIL, 2001).

Com o propósito de atender a esses requisitos, a resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004, vem ao encontro dos objetivos da CEME no sentido de exigir a comprovação da eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos, através de métodos analíticos devidamente validados de acordo com o guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos (BRASIL, 2003a; 2004a). De forma a corroborar com a RDC nº48, em mesma data foi publicada a lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos e o guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica destes medicamentos (BRASIL, 2004c; 2004d).

Em reconhecimento aos fitoterápicos com maior número de estudos científicos, a ANVISA nesse mesmo ano publicou uma lista de fitoterápicos com registro simplificado. Essa resolução foi revogada em 2008 não sendo necessário validar indicação terapêutica e segurança de uso para os medicamentos fitoterápicos pertencentes a esta listagem, desde que estes cumpram com as normas definidas por essa legislação (BRASIL, 2004b; 2008). Além disso, outras legislações se aplicam aos medicamentos fitoterápicos da mesma forma que normatizam os medicamentos alopáticos tais como o regulamento para Certificação de Boas Práticas de Fabricação e Controle (CBPFC) e as normas sobre publicidade de medicamentos (BRASIL, 2000b; 2003b).

No ano de 2006 o Ministério da Saúde aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (PNPIC) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos estimulando o desenvolvimento comunitário, a solidariedade e a participação social. Ambas as regulamentações incentivam o uso de plantas medicinais e fitoterápicos priorizando a biodiversidade brasileira. Esses modelos nacionais são fundamentais para tornar o acesso à saúde pública mais abrangente e de melhor qualidade cumprindo com as considerações e estímulo ao uso da medicina tradicional, complementar e alternativa da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2002; BRASIL, 2006a; 2006b).

Mesmo com todos os incentivos por parte do governo, até março de 2008, dos 512 medicamentos fitoterápicos registrados na ANVISA, somente 30% são de espécies nativas da América do Sul, indicando, portanto, a necessidade de investimentos em pesquisa envolvendo a avaliação da eficácia e segurança das espécies medicinais brasileiras (CARVALHO *et al.*, 2008).

Com o desenvolvimento da pesquisa científica, a criação de modelos nacionais de saúde e comunidades detentoras do conhecimento da medicina tradicional, países como o Brasil que conta com aproximadamente 200.000 espécies registradas e cerca de 20% de toda a flora mundial, tem potencial para ocupar lugar de destaque no cenário internacional. Dessa forma, atende as necessidades específicas do país, estimula o crescimento da economia, tornando, ainda, o processo menos oneroso para o Sistema Único de Saúde (FUNARI; FERRO, 2005).

2.2 *Mikania laevigata* e *Mikania glomerata* – Uma revisão

No Brasil as espécies de *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker e *Mikania glomerata* Sprengel, popularmente conhecidas como guaco, são amplamente utilizadas com evidências pré-clínicas para o tratamento de doenças onde estejam envolvidas suas ações broncodilatadoras, anti-inflamatória e anti-espasmódica (NEVES; SÁ, 1991; BIGUETTI, 1999). Em virtude do grande número de informações disseminadas na literatura sobre ambas as espécies, uma revisão completa foi realizada envolvendo aspectos farmacológicos, toxicológicos, químicos, agrônômicos, morfoanatômicos, genéticos e o uso do guaco nos programas de fitoterapia do Brasil (GASPARETTO *et. al.*, 2010). O objetivo desta revisão foi contextualizar a extensão dos avanços realizados até o presente momento sobre estes aspectos, e dessa forma corroborar com futuras pesquisas. A revisão das espécies de *M. glomerata* e *M. laevigata* encontra-se disponível no anexo 1 do presente trabalho.

2.2.1 Controle de qualidade de fitoterápicos a base de guaco

A ANVISA através da resolução nº 48/2004 que normatiza o registro de fitoterápicos no Brasil exige que o controle de qualidade seja realizado em todas as etapas de processamento da droga vegetal, incluindo a análise do produto final, o fitoterápico. Nesse sentido, alguns ensaios devem ser realizados a fim de garantir autenticidade, pureza e integridade, e composição química detalhada através de análises qualitativas e quantitativas (BRASIL, 2004a).

A literatura traz poucos relatos sobre o controle dos parâmetros físicos e químicos dos extratos de guaco, sendo avaliados de uma forma geral a densidade, o pH e o resíduo seco. Em contra partida, um grande número de estudos foram encontrados avaliando a composição química dos extratos, sendo a cumarina (1,2-benzopirona) o principal foco das pesquisas. Este metabólito é monitorado principalmente por técnicas como CCD, CG e CLAE (OLIVEIRA; SAITO; GARCIA, 1993; ABOY *et al.*, 2000; BIGUETTI *et al.*, 2005; BRASIL, 2005; YATSUDA *et al.*, 2005; MUCENEEKI *et al.*, 2009)

Adicionalmente deve-se enfatizar que, apesar do amplo uso dos fitoterápicos a base de guaco pela população brasileira, apenas três publicações envolvendo o controle de qualidade da especialidade farmacêutica xarope foram encontrados na literatura. Nesses trabalhos, além de os métodos analíticos utilizados serem laboriosos, pois exigem várias etapas de extração, são direcionados somente ao marcador químico cumarina, e não a outros possíveis marcadores relacionados ao efeito terapêutico (ROCHA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008; BUENO; BASTOS, 2009). Os métodos analíticos aplicados qualitativamente e quantitativamente aos extratos, tinturas, óleos essenciais e nas formas farmacêuticas a base de guaco encontram-se descritos no anexo 2 deste trabalho.

2.2.2 Metabólitos majoritários dos extratos medicinais de guaco

A agência regulamentadora de medicamentos do Brasil (ANVISA) considera apenas a cumarina o marcador químico do guaco. De acordo com este órgão, a

dose diária recomendada deste marcador pode variar entre 0,500 a 5,00 mg (BRASIL, 2008). No entanto, ensaios *in vivo* e *in vitro* demonstraram que além da cumarina, outros compostos biologicamente ativos estão presentes no extrato medicinais de guaco (LEITE *et al.*, 1993). Nesse sentido os diterpenos têm despertado bastante interesse, no que se refere à ação farmacológica, principalmente os que constituem a classe dos cauranos, como por exemplo, o ácido caurenóico isolado de *M. glomerata* e *M. laevigata* (Tabela 2 do anexo 1).

O ácido caurenóico tem apresentado diversas atividades farmacológicas, dentre elas ação antibacteriana, anti-parasitária, anti-câncer, antifúngica, hipotensora, anti-inflamatória e relaxante muscular lisa (BARBOSA; FERREIRA; VALENTE, 1994; GHISALBERT, 1997; LOBITZ; TAMAYO-CASTILLO; MERFORT, 1997; REZENDE *et al.*, 2000; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2002; MONGELLI *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2002; WILKENS *et al.*, 2002; COTORAS; FOLCH; MENDOZA, 2004; TIRAPELLI *et al.*, 2004; CAVALCANTI *et al.*, 2006). Importante mencionar foi sua atividade antinociceptiva induzida por ácido acético em camundongos, sendo também um potente relaxante da contração uterina através de mecanismos independentes de receptores β_2 adrenérgicos e, ao que tudo indica antagonista dos canais de cálcio (BLOCK *et al.*, 1998; CUNHA *et al.*, 2003). Estes resultados reforçam sua contribuição para afecções do trato respiratório.

Pesquisas com pneumonite alérgica em ratos demonstraram sinergismo entre os compostos presentes nos extratos hidroalcoólicos de *M. glomerata* e *M. laevigata* para produção dos efeitos farmacológicos desejados, incluindo o precursor da cumarina, o ácido o-cumárico, também descrito como o um dos principais compostos presentes nos extratos medicinais (SANTOS *et al.*, 2006; MUCENEEKI *et al.*, 2009).

Outros metabólitos tais como a dihidrocumarina e o siringaldeído também tem sua importância descrita na literatura. Ao siringaldeído, muito conhecido por suas propriedades flavorizantes, é atribuído principalmente atividades antioxidante e anti-inflamatória através da inibição da prostaglandina sintetase - COX-2 (FARAH; SAMUELSSON, 1992; VAN DEN WORM *et al.*, 2001; BORTOLOMEAZZI *et al.*, 2007; STANIKUNAITE *et al.*, 2009). Além disso, este metabólito é considerado um dos compostos majoritários isolado recentemente nos extratos medicinais de guaco através de CLAE semipreparativa (PEDROSO *et al.*, 2008).

A dihidrocumarina, por sua vez, possui atividade antioxidante, o que contribui para prevenção ou redução de danos aos tecidos, quando da ocorrência de

processos inflamatórios (KOSUGE; CONN, 1962; HOULT; PAYA, 1996; VAN DEN WORM *et al.*, 2001). Este metabólito também é relatado como um dos principais compostos encontrados nos extratos de *M. glomerata* correspondendo a 2% do total das frações hexânicas e etanólicas obtidas deste extrato (YATSUDA *et al.*, 2005). Apesar de seu amplo uso na indústria cosmética e de alimentos, a consideração a ser feita é que a dihidrocoumarina é capaz de perturbar processos epigenéticos em *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, causa elevados números de apoptose em células humanas (linfoblastos) devido ao aumento da acetilação da proteína supressora de tumor (p53) (OLAHARSKI *et al.*, 2005). Para este metabólito, também foi observado aumento relativo de massa do fígado de ratos quando tratados com dieta a base de dihidrocoumarina, entretanto, a toxicidade é pouco expressiva, e não causa grandes alterações celulares tanto *in vivo* quanto *in vitro* (LAKE *et al.*, 1989; LAKE *et al.*, 1994; OLAHARSKI *et al.*, 2005).

Em virtude da maioria dos trabalhos monitorarem apenas a coumarina, dos relatos de sinergismo entre os compostos majoritários presentes nos extratos medicinais de guaco (coumarina, ácido o-cumárico, dihidrocoumarina, ácido caurenóico e siringaldeído) e dos efeitos farmacológicos atribuídos a estes metabólitos, o presente trabalho visa o controle de qualidade dos principais compostos relacionados ao efeito terapêutico do guaco.

2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) surgiu na década de 60 como a aplicação da cromatografia líquida às teorias e instrumentações desenvolvidas originalmente para cromatografia gasosa. A principal diferença entre a Cromatografia Líquida e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência está no princípio de que a eficiência da separação aumenta com a diminuição do tamanho da partícula da fase estacionária, tornando necessária a utilização de bombas para a eluição da fase móvel (CASS; DEGANI, 2001).

Nos últimos anos, essa técnica de separação passou a ser uma das mais utilizadas para fins qualitativos e quantitativos, e as razões para esse crescimento estão na sensibilidade e na seletividade do método, com destaques em

determinações ambientais, médicas e principalmente nas indústrias farmacêuticas. Os números são surpreendentes sendo estimados que mais de 90% dos laboratórios de análises espalhados pelo mundo utilizam pelo menos uma modalidade de CLAE em fase reversa (TONHI *et al.*, 2002).

O princípio de separação é baseado nas características físico-químicas de cada composto e uma ou mais interações entre o soluto e a fase estacionária, o que resulta numa migração pela coluna de forma seletiva. Essas interações podem ser pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals, aos quais de acordo com sua natureza, classificam os modos de separação em cromatografia em fase reversa, cromatografia em fase normal, cromatografia de troca iônica e cromatografia por exclusão (CASS; DEGANI, 2001).

A cromatografia em fase reversa é a mais utilizada e consiste em uma fase estacionária de baixa polaridade e uma fase móvel de maior polaridade enquanto que a fase normal tem as polaridades invertidas (TONHI *et al.*, 2002). A escolha do modo mais adequado de separação cromatográfica é baseada na natureza do composto, no peso molecular, na polaridade e no caráter iônico, dependendo, além disso, da fase estacionária e da fase móvel para cada classe de soluto (CASS; DEGANI, 2001)

O equipamento é composto por alguns módulos como bombas de pressão e fluxo constante, injetor de amostra, forno da coluna, detector, interface de dados e computador. Na atualidade, estes módulos são totalmente computadorizados e permitem que alguns parâmetros como temperatura da coluna, vazão de fluxo, e alteração na composição da fase móvel (eluição gradiente) sejam alterados individualmente no equipamento, sendo estes fundamentais para o desenvolvimento dos métodos analíticos. Além disso, a composição da fase estacionária é um fator de grande relevância na separação de compostos e deve ser avaliada antes do desenvolvimento do método (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; CASS; DEGANI, 2001).

A temperatura do forno é um parâmetro muito importante em CLAE, pois afeta diretamente o perfil cromatográfico dos compostos. Além disso, favorece na redução do tempo de retenção principalmente de amostras ionizáveis, embora as amostras neutras também possam ter mudanças significativas na retenção. Portanto é um parâmetro muito útil para melhorar a resolução entre picos, sem haver necessidade de mudança de coluna ou da fase móvel (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

A vazão de fluxo da fase móvel também é um parâmetro importante para separação de compostos em CLAE, pois, afeta diretamente o tempo de retenção dos analitos e a pressão do sistema (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). A eluição gradiente por sua vez, é uma alternativa para melhorar a resolução e a seletividade do método, favorecendo, adicionalmente, na separação de macromoléculas e na diminuição do tempo de corrida em amostras que contenham analitos com ampla faixa de retenção (K). As desvantagens da utilização deste sistema estão principalmente em sua maior complexidade, pois possui um maior número de variáveis, o que dificulta a reprodutibilidade dos dados (CASS; DEGANI, 2001).

Os sistemas de detecção utilizados em CLAE são os mais diversos. Alguns parâmetros como alta sensibilidade, alta seletividade, rapidez de resposta, informação qualitativa do pico desejado, linearidade, baixo limite de detecção e estabilidade frente a mudanças de temperatura e composição da fase móvel caracterizam a escolha do sistema. Os mais utilizados por sua vez são o arranjo de foto diodos ou UV-Visível (mais utilizado), fluorescência, índice de refração, infravermelho, polarímetro e dicroísmo circular, eletroquímicos, espalhamento de luz (light-scattering), ressonância nuclear magnética e espectrômetro de massas (EM). Esse último por sua vez, é ideal para a química analítica por ser universal, apresentar alta sensibilidade, fornecer massa molecular dos solutos e contribuir com a elucidação estrutural destes. (CASS; DEGANI, 2001).

2.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O espectrômetro de massas é um instrumento que permite determinar a massa molecular de compostos eletricamente carregados por um sistema de ionização, ou íons previamente formados pela dissociação molecular induzida por colisão (COLE, 1997).

Graças a alta sensibilidade e a capacidade de identificar íons através da razão massa/carga (m/z), os espectrômetros de massas são considerados de extrema relevância para a indústria farmacêutica, pois, além de grande êxito como suporte analítico, é um dos primeiros métodos de escolha para elucidação estrutural de novas moléculas (NIESSEN, 1999; GLISH; VACHET, 2003).

Em outras áreas como na química de polímeros, análises ambientais, bioquímicas, toxicológicas, farmacológicas, biotecnológicas e, recentemente nas áreas de alimentos e perfumaria, os espectrômetros de massas vêm ganhando interesse tornando-se fundamentais como recurso para novas pesquisas. Este fato se dá principalmente pela diversidade de técnicas desenvolvidas até o presente momento, sendo a mais importante delas, a hifenação do espectrômetro de massas com o cromatógrafo líquido (CLAE-EM), ao qual tem possibilitado a análise de compostos orgânicos polares, não voláteis e termo lábeis (WATSON, 1997; MAURER, 1998; NIESSEN, 1999; MARQUES, 2006).

Para que possamos entender o funcionamento de um espectrômetro de massas, é necessário compreendermos os três principais componentes do equipamento: a fonte de ionização, o analisador e o detector. A diferença entre esses componentes distingue os tipos de técnicas as quais independentemente da escolha, exige primeiramente que a amostra seja ionizada em uma fonte de ionização (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; GLISH; VACHET, 2003).

Diversas fontes de ionização são descritas na literatura, porém as mais comuns e utilizadas são a Ionização através de Eletrospray (ESI) e a Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI) aos quais se tornaram padronizadas nos espectrômetros de massas da atualidade (KORFMACHER, 2005).

A técnica de ionização por ESI foi desenvolvida em 1984 por Yamashita & Fenn e na década de 90, passou a ser extensamente utilizada na análise de fármacos, metabólitos e produtos de degradação (SMYTH, 2005). Ambos, ESI e APCI ocorrem à pressão atmosférica e utilizam alta voltagem para fornecer ionização necessária à formação de íons, aos quais podem ser detectados e quantificados nos espectrômetros de massas (KORFMACHER, 2005). Na ESI, o processo de ionização ocorre através de um capilar ao qual recebe uma diferença de potencial em relação a um contra-eletródo de voltagens entre 500 e 4500 V, enquanto que em APCI, a ionização se dá através uma agulha a qual produz uma descarga elétrica (corona) diretamente sobre a amostra (GLISH; VACHET, 2003).

A APCI possui notáveis atributos como o fácil acoplamento ao cromatógrafo líquido e a baixa susceptibilidade a interferência de matrizes que contenham sal. Além de tudo, possui capacidade de ionizar rapidamente moléculas pouco polares sendo muito utilizada para o monitoramento de drogas e metabólitos de origem humana e animal. A desvantagem da técnica está em amostras termo lábeis devido

à possível decomposição originada pelas altas temperaturas na fonte. Além disso, alguns solventes podem suprimir completamente a formação dos íons de interesse (VAN BRAMER, 1997; MAURER, 1998).

A ESI, por sua vez, é considerado o mais robusto dos processos de ionização, sendo ainda, o mais utilizado em laboratórios clínicos. Este tipo de fonte é um processo de ionização brando, ao qual mantém intacta a molécula precursora com uma ou múltiplas cargas carregadas positivamente ou negativamente de acordo com o sistema dado ao capilar de ionização da amostra. Além disto, este sistema trabalha muito bem com mistura de solventes aquosos e orgânicos sendo, portanto, o mais apropriado para a hifenação com o cromatógrafo líquido em análises quantitativas analíticas e bioanalíticas. Outra grande vantagem desta técnica está na despreocupação com o tamanho das moléculas a serem ionizadas, o que possibilita o estudo de proteínas e de complexos multimoleculares. Adicionalmente, ESI é uma técnica rápida, sensível, capaz de investigar matrizes complexas com alta sensibilidade e ainda, sem a preocupação com os analitos termicamente sensíveis, o que justifica seu amplo uso (VAN BRAMER, 1997; DOOLEY, 2003; GLISH; VACHET, 2003; NIESSEN, 2003). Como qualquer técnica de ionização, ESI também possui deficiências como a necessidade de fluxo constante da amostra (o que viabiliza certo desperdício), além da dificuldade com o efeito de supressão iônica em matrizes que contenham concentrações maiores que 1mM de sal (GLISH; VACHET, 2003).

Tais como as fontes de ionização, diversos também são os tipos de analisadores aos quais tem a finalidade de separar os íons de acordo com a sua razão massa carga (m/z) e transmiti-los até o detector. A escolha do melhor tipo de analisador depende da resolução desejada, do intervalo de massas a ser analisado e do limite de detecção para cada aplicação (VAN BRAMER, 1997).

Na atualidade existem cinco tipos de analisadores de massas aos quais são divididos em dois grupos: Analisadores de transmissão e os de captura. Nos analisadores de transmissão, os íons deixam a fonte de ionização e são transmitidos até o detector através de um campo eletromagnético. Nos analisadores de captura, os íons são armazenados dentro do analisador através de um campo eletromagnético onde podem ser avaliados ou injetados para outra fonte externa de íons (VAN BRAMER, 1997; GLISH; VACHET, 2003).

São exemplos de analisadores de captura o Tempo de Vôo-TOF (Time of Fly), ao qual possui grande capacidade de obter espectros de massas de alta resolução, alta eficiência de transmissão e rapidez na obtenção de espectros; Captura de Íons (Ion Trap), considerado relativamente barato, rápido e sensível com capacidade de fornecer dados importantes para elucidação estrutural de moléculas; e a Ressonância Ciclotrônica de Íons (ICR) utilizada em pesquisas altamente especializadas devido a sua alta performance na exatidão, sensibilidade e resolução.

Como exemplos de analisadores de transmissão, o mais comum é o Quadrupolo Simples (Single Quadrupole) ao qual fornece o espectro de massas de cada pico cromatográfico eluído de um cromatógrafo líquido (KORFMACHER, 2005). Outro exemplo deste grupo é o Triplo Quadrupolo (Q) que, embora não seja o mais comum, é o mais utilizado para doseamentos analíticos e bioanalíticos, ao qual possui, adicionalmente, fundamental importância na identificação de compostos (VAN BRAMER, 1997; KORFMACHER, 2005; CATALDI; BIANCO; ABATE, 2008).

Os analisadores tipo triplo quadrupolo são relativamente baratos, compactos, rápidos e de alta eficiência de transmissão e consistem basicamente em quatro barras cilíndricas dispostas simetricamente umas das outras. Dentro do espectrômetro de massas, um campo elétrico acelera os íons para fora da fonte de ionização e para dentro dos quadrupolos. A transmissão se dá através de uma rádio frequência (RF) e uma corrente de voltagem (DC) aplicada aos eletrodos a qual oscila o campo elétrico funcionando como um filtro, transmitindo até o detector somente a m/z selecionada (VAN BRAMER, 1997).

A grande vantagem desta técnica está nos recursos de análise sequencial, também conhecida como espectrometria de massas e recursos *tandem* (EM-EM) a qual é muito utilizada em estudos de bioequivalência e de biodisponibilidade (CASS; DEGANI, 2001; KORFMACHER, 2005). Devido a excelência deste recurso, a espectrometria de massas teve um aumento considerável de aplicações na última década, principalmente nas áreas de bioquímica, genética, farmacologia e proteômica as quais contribuíram para aumento exponencial de publicações da literatura médica e da química clínica (DOOLEY, 2003).

O analisador do tipo triplo quadrupolo possui dois sistemas seletivos de filtros de massas aos quais são dispostos em série sequenciais. Íons de particular massa/carga (precursores) são selecionados em um primeiro filtro de massas sendo direcionados para uma câmara de colisão, onde se chocam com um gás inerte

formando íons fragmentos (Figura 01). Isto aumenta significativamente a especificidade da detecção de uma determinada molécula, pois os fragmentos dos íons formados são característicos para cada composto, o que permite definir adicionalmente, a classe de cada molécula precursora, uma vez que os íons fragmentos são característicos de cada classe de compostos (DOOLEY, 2003).

Após a passagem dos íons pelo analisador estes são transmitidos até o detector, gerando um sinal através da formação de elétrons secundários que são amplificados, ou induzindo uma corrente gerada por uma carga móvel. Vários tipos de detectores para espectrômetros de massas estão disponíveis no mercado sendo o mais comum o multiplicador de elétrons. Os critérios mais importantes que distingue diferentes tipos de detecção de íons são a sensibilidade, a precisão e o tempo de resposta. Um multiplicador de elétrons, por exemplo, apresenta resposta rápida em sistemas acoplados a cromatografia, permitindo varreduras de massas de 50-500 Da em 0,1 segundo (SIUZDAK, 1996; MURGU, 1998).

Além dos espectrômetros mencionados, outros tipos são encontrados no mercado incluindo os sistemas híbridos. Estes combinam dois ou mais tipos de analisadores tornando o sistema altamente especializado de acordo com a necessidade do usuário. São exemplos de acoplamento o Q-Ion Trap, Q-TOF, Qq-TOF e o LTQ-FTICR-MS (LOBODA *et al.*, 2000; KORFMACHER, 2005; CATALDI; BIANCO; ABATE, 2008).

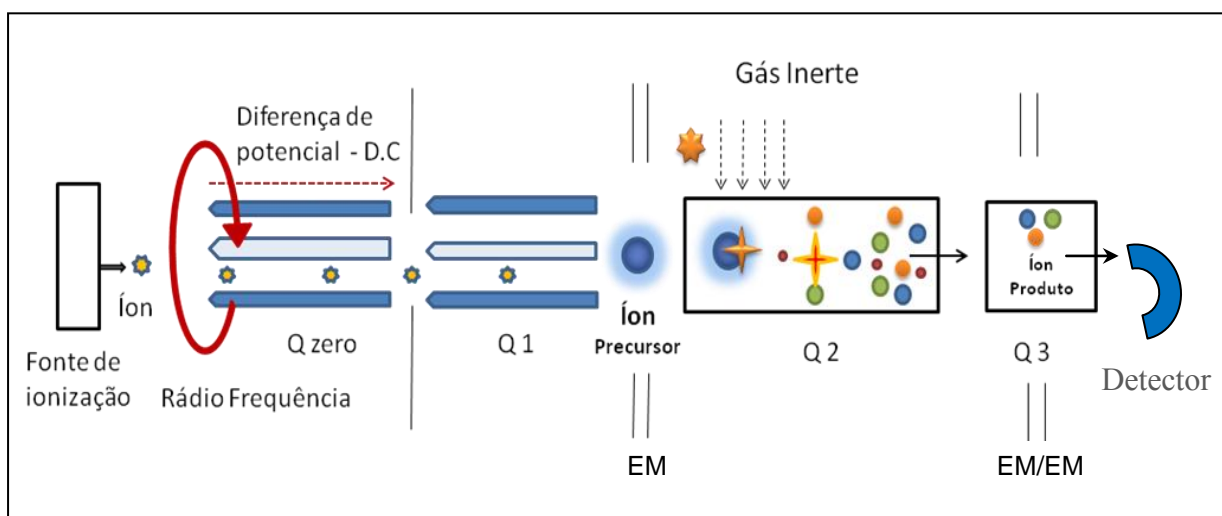


FIGURA 01- ESQUEMA GERAL DE UM ANALISADOR DE MASSAS DO TIPO TRIPLO QUADRUPOLO.

Fonte: KORFMACHER, 2005, com modificações.

NOTA: Após o analito ser ionizado na fonte, um diferencial de potencial é aplicado juntamente com uma rádio freqüência permitindo sua focalização (Q zero). Em seguida, o íon é transmitido até o primeiro quadrupolo (Q1) onde é obtido o espectro de massas (EM). Em uma próxima etapa, o íon é submetido a uma câmara de colisão (Q2) onde se choca com um gás inerte e se fragmenta. Os fragmentos são transmitidos a um terceiro quadrupolo (Q3) onde são direcionados até o detector.

2.5 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Os medicamentos são cada vez mais objetos de pesquisas e de preocupação quanto ao seu controle de qualidade. A necessidade de se mostrar qualidade nas análises está cada vez mais exigida e reconhecida, não só por evitar a condução de decisões desastrosas, mas também por impedir prejuízos financeiros irreparáveis às indústrias (ROCA *et al.*, 2007). Nesse sentido, a escolha do método de quantificação a ser desenvolvido por um laboratório, é de extrema relevância, e deve levar em consideração a adequabilidade de acordo com o tipo de matriz e da substância de interesse (IUPAC, 1995).

Todavia, o desenvolvimento de um método analítico por si só não assegura a realização dos ensaios, pois mesmo que o método esteja otimizado, seu desempenho não pode ser garantido. A este método, existe somente um potencial para alcançar uma padronização de confiança quando aplicado em determinadas circunstâncias, sendo importante seu monitoramento, a fim de garantir

adequabilidade para seu propósito (IUPAC, 1995). Por isso, quando da conclusão do desenvolvimento de um método analítico, para garantia de resultados confiáveis e interpretáveis, não somente a otimização de parâmetros deve ser realizada, mas também a validação do método desenvolvido, principalmente, quando envolver a aplicação de uma substância em um determinado tipo de matriz e não apenas em estudos com soluções padrão (POLESSELO, 1997; ABNT, 2005; ROCA, 2007).

2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

O objetivo da validação de um procedimento analítico é o de demonstrar que este é adequado para a sua finalidade, o que inclui as características aplicáveis à identificação, controle de impurezas e testes quantitativos (ICH, 2005). Deve ser utilizada para métodos não normalizados, criados ou desenvolvidos pelo próprio laboratório, ampliações e modificações dos métodos normalizados ou ainda, para métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos (ABNT, 2005). A determinação das características de desempenho de um método é somente uma parte do processo de validação e os critérios de aceitação são baseados no seu uso intencional (BARROS, 2002).

Um método analítico a ser validado deve apresentar determinados parâmetros como exatidão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, especificidade, intervalo, robustez e precisão, sendo esta última considerada em três níveis: precisão intra-corrida (repetibilidade), precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) e precisão inter-corridas (intermediária), necessária somente quando não houver comprovação da reprodutibilidade. Estes parâmetros devem ser realizados antes da implementação de um método analítico para quantificação de um fármaco ou metabólito. Adicionalmente, substâncias de referência oficializadas em farmacopéia devem ser utilizadas na validação do método, ou na inexistência destas, um padrão de trabalho pode ser empregado, desde que a identidade e o teor sejam devidamente comprovados (BRASIL, 2003a).

Como desfecho, embora validar um método analítico seja minucioso e laborioso, é de grande importância na garantia de resultados eficientes e produtivos, pois denotam confiabilidade nos resultados. Além disso, para que o estudo tenha

êxito, também é necessário conhecer as diretrizes da legislação vigente. Dessa forma, é possível obter um processo de qualidade assegurada ao qual atenda às necessidades de uma determinada aplicação ou área de aplicação (BRASIL, 2003a; RIBANI *et al.*, 2004).

2.6.1 Parâmetros para validação de métodos analíticos

2.6.1.1 Especificidade e Seletividade

Este parâmetro é definido como a habilidade de um método analítico de medir e diferenciar o composto em estudo, de outros componentes que possam estar presentes na amostra como metabólitos, impurezas, compostos de degradação ou componentes da matriz (BRASIL, 2003a; ICH, 2005).

Os termos seletividade e especificidade têm sido definidos pelo ICH com o mesmo significado, porém, apesar de gerar certa confusão, deve-se utilizar apenas o termo seletividade como sugerido pela International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC e pela Association of Analytical Communities - AOAC International (VESSMAN, 1996; USP, 2008). O Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial do Brasil (INMETRO), dá uma definição mais abrangente sobre este parâmetro inferindo que um método de separação que causa resposta para uma única substância de interesse pode ser chamado específico e um método que produz resposta para vários compostos químicos, com uma característica em comum pode ser chamado de seletivo (INMETRO, 2003).

Para um método instrumental de separação, a seletividade é o primeiro passo a ser avaliado no desenvolvimento de uma metodologia devendo ser reavaliada continuamente durante a validação. Este procedimento deve ser adotado, uma vez que algumas amostras podem sofrer degradação gerando compostos não observados anteriormente (RIBANI *et al.*, 2004).

Em análises quantitativas e de impurezas, a avaliação da seletividade é dada através da comparação dos resultados obtidos de amostras contaminadas com impurezas ou excipientes, e amostras não contaminadas, de forma a garantir que o

resultado do teste não seja influenciado por esses materiais. Quando da ausência de impureza ou do padrão, outra forma de avaliação pode ser realizada comparando-se os resultados obtidos através das amostras com um segundo método bem caracterizado, como por exemplo, uma metodologia farmacopêica ou um procedimento validado, devendo incluir amostras armazenadas sob condições de estresse (luz, calor, umidade, hidrólise e oxidação) (BRASIL, 2003a).

Na impossibilidade de obtenção da matriz isenta de substância de interesse, o método da adição do padrão pode ser aplicado. Este método consiste na comparação de uma curva analítica realizada com a adição do padrão na amostra, e uma curva analítica obtida em solução, sem a presença da matriz. Se após a análise de regressão linear os coeficientes angulares estiverem próximos, ou seja, se as retas estiverem paralelas, significa que o método é seletivo, não havendo, portanto, interferência da matriz na determinação da substância de interesse (RIBANI *et al.*, 2004).

Por fim, a utilização de outra técnica analítica também é uma forma de avaliar a especificidade de um método. Após a coleta da substância de interesse, métodos específicos para avaliação de estrutura molecular como espectrometria de massas, ressonância nuclear magnética e espectroscopia no infravermelho, garantem, de forma inequívoca, que não há interferências na determinação do composto de interesse frente à presença de outros componentes em uma dada matriz (JANKE, 1998; BRASIL, 2003a).

2.6.1.2 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção é denominado como sendo a menor concentração de uma dada substância que o procedimento analítico consegue diferenciar confiavelmente do ruído de fundo, ou seja, a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (BRASIL, 2003a; ICH, 2005; USP, 2008).

Para procedimentos analíticos instrumentais que demonstram o ruído da linha de base (CLAE, CG, Espectrômetro de Massas), a determinação do LD é realizada através da relação sinal-ruído. Neste método, compara-se a medição dos sinais do

composto de interesse em baixas concentrações em relação a um branco. A estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de duas a três vezes o ruído da linha de base podendo ainda ser expressa de acordo com a equação abaixo:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}$$

em que: IC é a inclinação da curva de calibração e DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação (INMETRO, 2003; BRASIL, 2003a; RIBANI *et al.*, 2004; ICH, 2005; USP, 2008).

2.6.1.3 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003a; ICH, 2005). Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios-padrão (INMETRO, 2003). De acordo com a ANVISA (Resolução 899 de 2003) o limite de quantificação pode ser determinado de duas maneiras sendo a primeira por meio da relação sinal/ruído onde se considera o limite de quantificação aquela concentração que produza uma relação de 10 vezes a linha de base obtida com um branco, ou ainda, pode ser expressa através da equação:

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

em que: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003a).

2.6.1.4 Linearidade e curva de calibração

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (INMETRO, 2003; BRASIL, 2003a; ICH, 2005; USP, 2008). A validação, quanto a este parâmetro analítico, deve garantir um máximo de precisão, exatidão e confiança nos resultados, permitindo a visualização de quais os valores de concentração possam se encontrar deslocados para um intervalo não linear de resposta (POLESELLO, 1996; USP, 2008).

De acordo com a legislação local brasileira, esse parâmetro é estabelecido pela análise de no mínimo cinco concentrações diferentes contemplando 80 a 120% da concentração teórica do teste. Através dos resultados obtidos, obtém-se uma relação matemática que pode ser expressa por uma equação de reta (curva de calibração). Se visualizado relação linear aparente entre os dados, faz-se necessário tratamento estatístico apropriado para determinação do desvio padrão relativo, intercepto da reta com o eixo y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos, e coeficiente de correlação linear (BRASIL, 2003a; ICH, 2005; USP, 2008).

2.6.1.5 Intervalo

O intervalo é derivado da linearidade e compreende a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico (faixa de trabalho), onde possam ser determinadas com precisão e exatidão as amostras que contenham quantidade de substâncias dentro do intervalo especificado (BRASIL, 2003a; ICH, 2005; USP, 2008). Os limites percentuais do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade, dependem da aplicação pretendida do método, porém, sempre que possível, a concentração do analito de maior probabilidade de ser encontrada, deve estar situada no centro da faixa de trabalho. Para determinação quantitativa de matéria prima ou forma farmacêutica, os intervalos especificados normalmente compreendem de 80 a 120% da concentração teórica do teste; para impurezas, a determinação varia desde o nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado (INMETRO, 2003; BRASIL, 2003a; USP, 2008).

2.6.1.6 Precisão

A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogenea, sob condições idênticas de ensaio (ICH, 2005; USP, 2008). Pode ser expressa em termos da característica da dispersão dos resultados, ou seja, através do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), de um número suficiente de determinações da amostra, de acordo com a fórmula a seguir (INMETRO, 2003; BRASIL, 2003a; USP, 2008):

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP (desvio padrão)} \times 100}{\text{CMD (concentração média determinada)}}$$

O valor máximo aceitável é definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, tipo de matriz e a finalidade do método, não sendo admitidos valores superiores a 5% (BRASIL, 2003a).

Este parâmetro de validação é considerado em três níveis, dentre os quais repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

2.6.1.6.1 Repetibilidade

Também conhecida com precisão intra-corrida, a repetibilidade expressa a precisão através da concordância entre os resultados de medições sucessivas em uma mesma amostra, tendo como parâmetros de avaliação um mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento em condições idênticas de uso, mesmo local e repetições em curto período de tempo (INMETRO, 2003).

A repetibilidade pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou ainda adição ao branco. De acordo com as Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos (DOQ-CGCRE) do INMETRO, são necessárias sete ou mais repetições para o cálculo do desvio padrão, em várias concentrações do intervalo de trabalho (INMETRO, 2003). A ANVISA e o ICH através de seus guias para validação de métodos analíticos preconizam o mínimo de seis determinações a 100% da concentração do teste ou três réplicas, (nove determinações) para cada faixa de concentração (baixa, média e alta), desde que contemplem a faixa linear do método (BRASIL, 2003a; ICH, 2005).

2.6.1.6.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária é referida como sendo a concordância entre os resultados de um mesmo laboratório por meio da utilização um mesmo método analítico (BRASIL, 2003a).

A importância deste parâmetro está no fato deste ser reconhecido como o mais representativo da variabilidade dos resultados de um único laboratório, sendo atribuída a este a reprodutibilidade dos resultados (RIBANI *et al.*, 2004). Conhecida também como precisão inter-corridas, a precisão intermediária avalia os efeitos aleatórios de um procedimento analítico. Essas variações são estudadas sobre uma mesma amostra, amostras idênticas ou em padrões incluindo dias diferentes (mínimo dois), analistas diferentes ou ainda equipamentos diferentes (INMETRO, 2003; BRASIL, 2003a; ICH, 2005). Na maioria dos casos, o valor da precisão intermediária é em função do nível de concentração do ensaio, e em condições pré-definidas, várias medições podem ser realizadas em replicatas ou em ensaio único sobre uma mesma amostra (INMETRO, 2003).

2.6.1.6.3 Reprodutibilidade

Reprodutibilidade ou precisão inter-laboratorial, é o grau de concordância entre os resultados de um mesmo mensurado, obtidos sob condições variadas de medição (diferentes laboratórios). Em geral é aplicada como forma de estudo colaborativo para padronização de uma metodologia analítica, e embora os resultados não precisem ser apresentados para concessão de registro, é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho de seus métodos em relação aos dados de validação obtidos (INMETRO, 2003; BRASIL, 2003a; ICH, 2005). Havendo comprovação da reprodutibilidade em ensaios de validação, não é necessária a comprovação da precisão intermediária (BRASIL, 2003a).

2.6.1.7 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade entre o valor aceito como verdadeiro ou de referência em relação ao valor encontrado (INMETRO, 2003; BRASIL, 2003a; ICH, 2005; USP, 2008). É determinada após o estabelecimento da

linearidade, precisão e seletividade, com no mínimo nove determinações (três réplicas) para cada faixa de concentração (baixa, média e alta) (BRASIL, 2003a; ICH, 2005). Diversos métodos para a determinação da exatidão são utilizados, e dentre os principais estão o uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais, comparação dos resultados do procedimento analítico proposto com um segundo procedimento já caracterizado e definido, ou através do cálculo da porcentagem de recuperação de uma quantidade conhecida do analito adicionada na amostra (INMETRO, 2003; ICH, 2005; USP, 2008). A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

2.6.1.8 Robustez

A robustez mede a capacidade de um método analítico de permanecer inalterado frente a pequenas, mas deliberadas variações, proporcionando durante o uso normal do método, fidelidade dos resultados (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; INMETRO, 2003; BRASIL, 2003a; ICH, 2005; USP, 2008). Nesse sentido, quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança quanto a sua precisão (INMETRO, 2003).

Para cromatografia líquida, a ANVISA e o ICH recomendam alguns fatores a serem modificados no ensaio de robustez, dentre eles: variação do pH da fase móvel, variação da composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, variação na temperatura de forno e variação no fluxo da fase móvel. No preparo das amostras, alguns fatores também devem ser considerados como a estabilidade das soluções analíticas e o tempo de extração, quando aplicável (BRASIL, 2003a; ICH, 2005).

Em exemplos mais práticos, para métodos onde CLAE seja utilizado, a literatura nos fornece algumas diretrizes quanto a parte experimental deste

parâmetro. Deste modo, a robustez pode ser avaliada variando a fase móvel em $\pm 2\%$, o pH da fase móvel em 0,1 unidade e a temperatura da coluna em $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se essas variações se encontrarem dentro dos limites de exatidão, seletividade e precisão, o método é considerado robusto e as variações podem ser incorporadas ao procedimento (RIBANI *et al.*, 2004).

Como informação adicional, se ao longo do desenvolvimento e validação das metodologias ocorrerem mudanças de fornecedores, marcas ou equipamentos sem alterações significativas nos resultados, diz-se que o método possui robustez intrínseca, uma vez que manteve sua resposta em meio a mudanças do ambiente de análise (RIBANI *et al.*, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE GUACO

Doze amostras entre xarope e solução oral de guaco foram obtidas no comércio local de Curitiba-PR, sendo sua composição, registro, teor declarado de ativo e datas de fabricação e validade descritos no Quadro 1. Os nomes dos fabricantes e o número de registro no Ministério da Saúde e da Agricultura não foram divulgados por questões éticas.

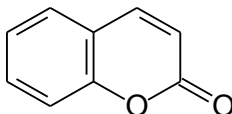
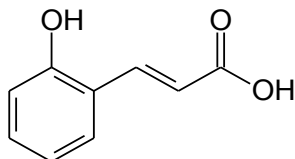
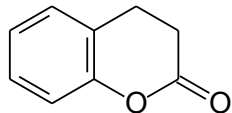
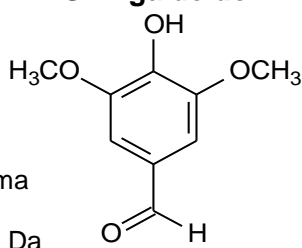
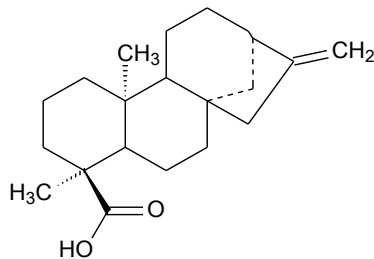
Fabricante	Registro	Fabricação e Validade	Composição	Teor declarado de ativo/ mL da amostra
Amostra 1	Ministério da Saúde	09.08/09.2010	<i>M. glomerata</i>	0,3 mg de cumarinas ou 81, 5 mg de extrato
Amostra 2	Ministério da Saúde	09.08/09.2010	<i>M. glomerata</i>	0,035 mg de cumarinas ou 0,1 mL de extrato
Amostra 3	Ministério da Saúde	03.08/03.2010	<i>M. glomerata</i>	0,0352 mg de cumarina ou 0,08 mL de extrato
Amostra 4	Ministério da Saúde	12.07/12.2009	<i>M. glomerata</i>	0,08 mg de cumarina ou 0,1 mL de extrato
Amostra 5	Ministério da Saúde	07.08/07.2010	<i>M. glomerata</i>	0,2 mg de cumarina ou 50 µL de extrato
Amostra 6	Ministério da Saúde	07.08/07.2010	<i>M. glomerata</i>	0,2 mg de cumarina ou 50 µL de extrato
Amostra 7	Ministério da Saúde	04.08/04.2010	<i>M. glomerata</i>	0,035 mg de cumarina ou 0,012 mL de extrato
Amostra 8	Ministério da Saúde	09.08/09.2010	<i>M. glomerata</i>	0,0833 mL de extrato
Amostra 9	Ministério da Saúde	10.08/10.2011	<i>M. glomerata</i> + associações	0,00833 mL de extrato
Amostra 10	Ministério da Saúde	06.08/06.2011	<i>M. glomerata</i> + associações	0,00833 mL de extrato
Amostra 11	Min. da Agricultura, pecuária e abastecimento	07.07/07.2009	Guaco (não especificado a espécie)	0,3 mL de extrato
Amostra 12	Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento	08.07/08.2010	Guaco (não especificado a espécie)	Extrato fluido 10%

QUADRO 1- DESCRIÇÃO DO REGISTRO, COMPOSIÇÃO E TEOR DE ATIVO DECLARADO NAS FORMAS FARMACÊUTICAS OBTIDAS NO COMÉRCIO LOCAL DE CURITIBA-PR.

A tintura hidroalcoólica e o extrato concentrado de guaco foram gentilmente cedidos pela Herbárium Laboratório Botânico LTDA.

3.2 OBTENÇÃO DOS PADRÕES ANALÍTICOS

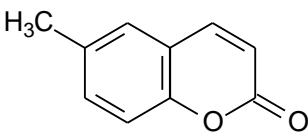
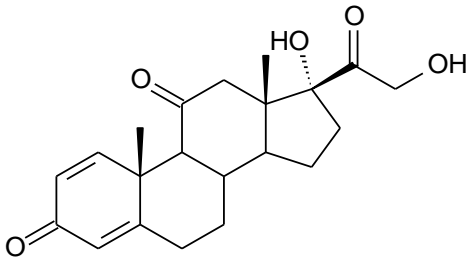
Para a análise de quantificação das formas farmacêuticas (Quadro 1), foram utilizados padrões analíticos de cumarina (1,2-benzopirona), ácido *o*-cumárico, dihidrocumarina e siringaldeído. Em virtude da dificuldade de obtenção do padrão analítico de ácido caurenóico, este foi purificado e gentilmente cedido pelo prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel (Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná) e pela Profa. Dra. Maique Weber Biavatti (Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina). As estruturas moleculares, a origem e o teor dos padrões das substâncias de referências são apresentadas no Quadro 2.

Metabólitos secundários do guaco em estudo	
<p>Cumarina (1,2 benzopirona)</p>  <p>Marca: Sigma Teor: 99% PM: 146,14 Da</p>	<p>Ácido <i>o</i>-cumárico</p>  <p>Marca: Sigma Teor: 97% PM: 164,16 Da</p>
<p>Dihidrocumarina</p>  <p>Marca: Sigma Teor: 99% PM: 148,16 Da</p>	<p>Siringaldeído</p>  <p>Marca: Sigma Teor: 98% PM: 182,17 Da</p>
<p>Ácido Caurenóico (Ácido caur-16-en-19-oico)</p> <p>Origem: Purificado em laboratório PM: 302,1 Da</p>	

QUADRO 2 – ESTRUTURA MOLECULAR, TEOR E ORIGEM DOS PADRÕES ANALÍTICOS UTILIZADOS NO ESTUDO.

A escolha destas substâncias foi devido às propriedades terapêuticas relacionadas a esses compostos, além destes serem descritos como majoritários nos extratos medicinais de guaco.

Para as análises através de CLAE-EM/EM foram utilizados os padrões internos 6-metilcumarina (modo positivo de ionização) e prednisona (modo negativo de ionização). Essas substâncias foram escolhidas em virtude de serem estáveis, de fácil ionização e por produzirem fragmentos intensos para análise de quantificação. As estruturas moleculares, a origem dos padrões e o teor de cada uma destas substâncias são apresentadas no Quadro 3.

Padrões internos utilizados para análises em CLAE-EM/EM	
<p>6-metilcumarina</p>  <p>Marca: Sigma Teor: 99% PM: 160,17 Da</p>	<p>Prednisona</p>  <p>Marca: INCQS – Farmacopéia Brasileira Teor: ≥ 99,9% PM: 358,43</p>

QUADRO 3 – ESTRUTURA MOLECULAR, TEOR E ORIGEM DOS PADRÕES INTERNOS UTILIZADOS PARA ANÁLISES EM CLAE-EM/EM.

3.3 OBTENÇÃO DAS MATRIZES DE XAROPE E DE SOLUÇÃO ORAL ISENTAS DOS METABÓLITOS DE INTERESSE

A matriz de xarope isenta dos metabólitos de interesse foi preparada aquecendo a 80 °C em um béquer de 1000 mL, 250 mL de água, 0,9 g de metilparabeno, 0,1 g de propilparabeno, 20 mg de sacarina e 425 g de sacarose (ROCHA *et al.*, 2008).

A matriz da solução oral isenta dos metabólitos de interesse foi gentilmente cedida pela Herbário Laboratório Botânico, não havendo necessidade de preparo

no laboratório. Essa matriz contém em sua composição água deionizada, sorbitol 70%, propilenoglicol, carboximetilcelulose sódica, sacarina, aroma de eucalipto, metilparabeno, edetato dissódico e propilparabeno sendo, portanto isenta de sacarose.

3.4 REAGENTES E SOLVENTES

Para o desenvolvimento do método, validação e quantificação dos cinco metabólitos secundários do guaco, todos os solventes utilizados foram grau CLAE. Etanol, metanol, e ácido fórmico 88% foram adquiridos da J. T. Baker Chemicals B. V. (Deventer, Holanda). Acetonitrila foi adquirida da Tédia (Fairfield, USA) enquanto que formiato de amônio da Acros Orgânicos (New Jersey, USA). Água ultra-pura foi obtida através do sistema de purificação Milli-Q – Millipore Corporation (Bedford, MA, EUA).

3.5 ANÁLISES ATRAVÉS DE CLAE-DAD

3.5.1 Preparo dos padrões

Para obtenção das soluções estoque, padrões analíticos de cumarina, ácido o-cumárico, dihidrocumarina, ácido caurenóico e siringaldeído foram quantitativamente pesados e em seguida, dissolvidos separadamente em metanol de modo a obter uma concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de cada composto. Todas as soluções estoques foram armazenadas sob refrigeração a 4°C .

A solução de trabalho foi obtida a partir das soluções estoques, de modo a obter uma mistura de concentração final de $200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada composto. A partir desta, outras soluções de trabalho foram preparadas através de novas diluições, de acordo com a necessidade de cada experimento. Todas as soluções de trabalho foram realizadas utilizando como diluente água/metanol/acetonitrila nas proporções

de 65:30:5 v/v/v, sendo estas filtradas através de filtro de seringa de PVDF (11 mm, 0,45 µm de poro, Millipore Millex) antes das injeções.

3.5.2 Análise dos padrões através de espectroscopia de ultravioleta

A verificação do perfil espectral de absorção de cada composto, bem como a otimização do comprimento de onda para leitura em CLAE-DAD, foi realizada através de ensaios de varredura em um espectrofotômetro UV-VIS Agilent 8453, sendo os dados foram processados através do software UVVIS Win System A 10.01.

Para realização deste ensaio, soluções estoque dos padrões de cumarina, ácido *o*-cumárico, dihidrocumarina, siringaldeído e ácido caurenóico foram diluídas separadamente em etanol de modo a se obter as seguintes concentrações: 20 µg mL⁻¹ de cumarina, ácido *o*-cumárico, dihidrocumarina e siringaldeído; 30 µg mL⁻¹ de ácido caurenóico. Estas soluções foram submetidas à varredura na região de 200 a 400 nm utilizando como branco etanol absoluto. As bandas de absorção foram avaliadas individualmente, sendo em seguida os espectros de varredura de cada composto sobrepostos. Foi considerado o melhor comprimento de onda para leitura em CLAE-DAD aquele onde foi possível monitorar os compostos com intensidade e seletividade adequadas.

3.5.3 Preparo das amostras comerciais de xarope e de solução oral de guaco

Para o preparo das formas farmacêuticas, foi considerada a melhor diluição onde fosse possível determinar, dentro de um intervalo de concentração estimado, o principal marcador químico do guaco, a cumarina. Além disso, foi considerada a menor diluição possível destas amostras para que outros metabólitos de menor concentração pudessem ser detectados. Dessa forma, para a quantificação através de CLAE-DAD, todas as amostras exceto a amostra 1(um), foram diluídas 1:1 v/v em água/metanol/acetonitrila, 65:30:5 v/v/v. A amostra 1 possui um teor declarado de

cumarina 10 vezes maior que as demais, e portanto, foram necessárias duas diluições, 1:10 e 1:1 v/v (Quadro 1, pág. 77).

Todas as amostras foram filtradas através de filtro de seringa de PVDF (11 mm, 0.45 µm, Millipore Millex) antes das injeções no cromatógrafo líquido.

3.5.4 Preparo das amostras de tintura e extrato concentrado de guaco

A determinação dos metabólitos secundário do guaco no extrato e na tintura foi realizada diluindo-se o extrato 1:50 v/v e a tintura 1:20 v/v. As diluições foram realizadas através de uma solução diluente composta por uma mistura de etanol/água nas proporções de 70:30 v/v. Antes das injeções no cromatógrafo líquido, o extrato e a tintura foram filtrados através de filtro de seringa de PVDF (11 mm, 0.45 µm, Millipore Millex).

3.5.5 Instrumentação

As análises de CLAE-DAD foram realizadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Agilent 1100 (Waldbronn, Germany), bomba quaternária G1311A, degaseificador G1379A, injetor automático G1320A e detector de fotodiodo (G1315B). Os dados foram processados através do software ChemStation versão A 10.02.

3.5.6 Desenvolvimento do método

Para o desenvolvimento do método inicialmente escolheu-se uma coluna Zorbax Eclipse XDB C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm de partícula). A amostra escolhida como referência para o desenvolvimento do método foi a 1 (um) a qual possui um

teor de cumarina declarado 10 vezes maior que as demais amostras, e em consequência disso, uma maior concentração de outros metabólitos.

Para seleção da fase móvel, diferentes combinações de água, metanol, acetonitrila e ácido fórmico foram avaliadas levando sempre em consideração o melhor perfil cromatográfico. Além disso, diferentes fluxos e temperaturas também foram considerados na tentativa de otimizar o tempo de corrida e a resolução entre os picos cromatográficos.

Após a otimização do método, a adequabilidade do sistema foi testada de acordo com a Farmacopéia Americana 31ª edição (USP, 2008) sendo os seguintes parâmetros cromatográficos analisados: Tempo de retenção (T_r), fator de retenção (K'), resolução (R_s), número de pratos teóricos (N) e fator de cauda (T).

3.5.7 Determinação do teor dos metabólitos secundários do guaco nas amostras de xarope e solução oral

O doseamento dos metabólitos secundários do guaco através de CLAE-DAD foi realizado nas seguintes condições:

- Fase móvel: Mistura de água/metanol/acetonitrila/ácido fórmico (65:30:5:1, v/v/v/v).
- Modo de eluição: Isocrático
- Pré-coluna: Zorbax Eclipse XDB-C18, tamanho 12,5 x 4.6 mm e 5 μ m de partícula (Agilent Technologies Inc.)
- Coluna: Zorbax Eclipse XDB-C18, tamanho de 150 x 4,6 mm e 5 μ m de partícula (Agilent Technologies Inc.)
- Temperatura de forno: 25 °C.
- Fluxo: 1 mL min⁻¹.
- Volume de injeção: 20 μ L

A fase móvel foi filtrada através de membrana de PTFE 0,45 μ m (Millipore, Molsheim, France). Após a injeção de cada triplicata das formas farmacêuticas, um

método curto de limpeza foi aplicado de forma a preservar a coluna. Este método consistiu em um gradiente entre acetonitrila e água iniciando em 50:50 v/v até um final de 100% de acetonitrila durante 3 minutos. Posteriormente a aplicação deste método, o sistema foi recondicionado durante 10 minutos com a fase móvel.

3.5.8 Validação do método analítico de CLAE-DAD

A validação do método foi determinada segundo critérios descritos na Resolução – RE nº 899, de 29 de março de 2003, ANVISA, categoria I que dispõe sobre testes quantitativos para a determinação de princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas (BRASIL, 2003a). De acordo com a legislação consultada, os ensaios a serem realizados para validação de um método analítico incluem: especificidade, linearidade, intervalo, exatidão, robustez e precisão. O limite de detecção não se faz necessário para métodos classificados na categoria I, porém o estudo foi realizado para obtenção de uma referência mínima de detecção em função da concentração de cada composto.

3.5.8.1 Seletividade

Devido à complexidade das matrizes, três métodos distintos foram aplicados para a avaliação da seletividade: método da comparação da matriz, método da adição do padrão e o uso de detector de arranjo de diodo.

O método da comparação da matriz consistiu em um comparativo entre as matrizes das formas farmacêuticas isentas dos metabólitos de interesse, e as matrizes fortificadas com padrões analíticos. Para realização deste ensaio, a matriz de xarope isenta dos metabólitos foi preparada de acordo com o método proposto por Rocha (2008) aquecendo a 80 °C em um béquer de 1000 mL, 250 mL de água, 0,9 g de metilparabeno, 0,1 g de propilparabeno e 425 g de sacarose (ROCHA *et al.*, 2008). Adicionalmente foi incorporada à forma farmacêutica desenvolvida a sacarina,

pois esta é comumente utilizada em xaropes como edulcorante. A matriz da solução oral isenta de sacarose e dos metabólitos foi gentilmente cedida pela Herbário Laboratório Botânico, não havendo necessidade de preparo no laboratório. As matrizes fortificadas foram obtidas através da adição a frio de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cumarina, dihidrocumarina, ácido o-cumárico e siringaldeído às matrizes isentas de metabólitos. Ambas, matrizes isentas e fortificadas foram injetadas no cromatógrafo líquido sendo em seguida os cromatogramas sobrepostos e comparados.

O método da adição do padrão foi determinado através da comparação de duas curvas analíticas, sendo uma obtida através de soluções padrão, e outra obtida através de uma amostra fortificada com padrões analíticos. Neste método, soluções padrão contendo uma mistura de cumarina, ácido o-cumárico, dihidrocumarina e siringaldeído foram preparadas em triplicata em três níveis de concentração aos quais 2.5 , 25 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada composto. Em seguida, amostras de xarope e de solução oral de guaco foram diluídas ($1:10 \text{ v/v}$) e fortificadas nos mesmos níveis de concentração das soluções padrão. As amostras fortificadas e as soluções padrão foram injetadas no CLAE sendo as áreas obtidas submetidas a análise de regressão linear. A seletividade foi avaliada comparando-se os coeficientes angulares obtidos entre as duas curvas analíticas.

O terceiro método utilizado para avaliar a seletividade foi através do uso de detector de arranjo de diodo. Nesse método, uma mistura dos padrões de cumarina, ácido o-cumárico, dihidrocumarina e siringaldeído ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$ cada) foram injetadas no cromatógrafo líquido juntamente com amostras de xarope e de solução oral fortificadas com os mesmos compostos, na mesma concentração. Os cromatogramas foram obtidos sendo em seguida, realizadas varreduras no ultravioleta (200 a 400 nm) dos picos cromatográficos dos padrões e seus correspondentes nas amostras. As bandas de absorção entre padrão e amostra foram sobrepostas e avaliadas. Não sendo verificada diferença entre as bandas de absorção, infere-se que o pico cromatográfico está puro, sendo, portanto, o método seletivo para tal analito.

3.5.8.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

LD e LQ foram estimados a partir da relação sinal/ruído e para tanto, soluções de $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cumarina, ácido o-cumárico, dihidrocumarina e siringaldeído foram diluídas de forma seriada em concentrações decrescentes até o menor pico detectável. As diluições foram realizadas em triplicata através de uma solução diluente composta por uma mistura de água/metanol/acetonitrila nas proporções de 65:30:5 v/v/v, conforme descrito na Tabela 01:

TABELA 01 – ESQUEMA DE DILUIÇÃO PARA O PREPARO DAS SOLUÇÕES DE CUMARINA, ÁC. O-CUMÁRICO, DIHIDROCUAMARINA E SIRINGALDEÍDO PARA O ESTUDO DO LIMITE DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO EM CLAE-DAD.

Solução de trabalho: $100 \mu\text{g mL}^{-1}$									
Volume da solução de trabalho (mL)	1,0	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0313	0,0393	0,0393	0,0393
Balão volumétrico (mL)	10	10	10	10	10	10	25	50	100
Concentração final de cada composto ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	10	5	2,5	1,25	0,625	0,313	0,157	0,079	0,039

O LD foi obtido através da menor concentração que resultou em um pico de três vezes o ruído da linha de base, e o LQ como a menor concentração ao qual resultou em um sinal/ruído maior que 10, com precisão e exatidão dentro dos limites aceitáveis.

3.5.8.3 Linearidade e intervalo de trabalho

A linearidade foi determinada através do método da padronização externa em oito níveis de concentração contemplando uma faixa de 1 a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ para cada composto. Para a realização deste ensaio, soluções de trabalho contendo uma mistura de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cumarina, ácido o-cumárico, dihidrocumarina e

siringaldeído foram preparadas e diluídas em triplicata até o menor ponto da curva de calibração. As diluições foram realizadas com uma solução diluente composta por água/metanol/acetonitrila nas proporções de 65:30:5 v/v/v. A elaboração do ensaio de linearidade é apresentado na Tabela 2.

TABELA 02 – ESQUEMA DE DILUIÇÃO PARA O PREPARO DAS SOLUÇÕES DOS METABÓLITOS DO GUACO PARA O ENSAIO DE LINEARIDADE EM CLAE-DAD.

Solução de trabalho contendo a mistura de cumarina, ácido o-cumárico, dihidrocumarina e siringaldeído (200 µg mL⁻¹ de cada composto)								
Volume da solução de trabalho (mL)	-	2,5	1,25	0,625	0,25	0,125	0,125	0,05
Balão volumétrico (mL)	-	5	5	5	5	5	10	10
Concentração final de cada composto (µg mL ⁻¹)	200	100	50	25	10	5	2,5	1,0

A curva de calibração foi construída através da elaboração de um gráfico relacionando a área obtida dos picos cromatográficos *versus* a concentração de cada nível, sendo a linearidade determinada através da análise de regressão linear. O intervalo de trabalho foi definido através dos níveis mínimos e máximos de concentração onde foi possível determinar as substâncias de interesse com melhor precisão e exatidão.

3.5.8.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada em dois níveis: repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia).

A repetibilidade foi determinada utilizando soluções de trabalho nos níveis de concentração de 2,5, 25 e 100 µg mL⁻¹ de cada composto. As amostras foram preparadas em triplicata, em período curto de tempo, em um mesmo dia, pelo mesmo analista. As injeções foram realizadas em um mesmo equipamento em condições idênticas de uso. Como forma de avaliar os resultados, o coeficiente de

variação (CV%) foi aplicado para verificar a dispersão dos resultados entre as duas corridas analíticas.

A precisão intermediária foi determinada por um segundo analista, nos mesmos níveis de concentração da repetibilidade, porém dois dias após este ensaio. O mesmo tratamento matemático da repetibilidade foi utilizado na comparação entre as áreas obtidas pelos dois analistas.

3.5.8.5 Exatidão

A exatidão foi realizada através do método da adição do padrão. Este ensaio consistiu na determinação da percentagem de erro relativo entre a concentração teórica e a concentração experimental dos analitos.

Para a obtenção da concentração teórica, soluções de trabalho contendo uma mistura de cumarina, dihidrocumarina, ácido *o*-cumárico e siringaldeído foram preparadas em solução diluente contemplando os níveis de concentração de 2.5, 25 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada composto. Essas soluções foram injetadas no cromatógrafo líquido em triplicata, sendo os resultados encontrados considerados como teóricos. As áreas correspondentes a cada analito, em cada nível de concentração foram submetidas à análise de regressão linear, gerando uma reta composta por nove pontos, ao qual foi utilizada para quantificação da concentração experimental.

Para a obtenção da concentração experimental, inicialmente uma amostra de escolha foi diluída 1:10 v/v em solução diluente composta por água/metanol/acetonitrila, 65:30:5 v/v/v. As amostras foram injetadas no cromatógrafo líquido em triplicata e o teor correspondente a cada metabólito registrado. Em seguida, esta amostra foi fortificada com padrões analíticos nos mesmos níveis da concentração teórica do ensaio. A quantidade recuperada dos analitos foi calculada subtraindo o teor encontrado nas amostras fortificadas daqueles obtidos nas amostras sem fortificação. De posse da concentração teórica e da concentração experimental, a porcentagem de recuperação pôde ser calculada através da equação:

$$E (\%) = \frac{\text{Concentração experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

Os resultados foram tratados estatisticamente através do coeficiente de variação e do intervalo de confiança no nível de 95%.

3.5.8.6 Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações as quais comumente podem ocorrer durante sua utilização. Nesse sentido, em nossos estudos foram variados:

- Fluxo da fase móvel (variação de $\pm 0,02 \text{ mL min}^{-1}$)
- Temperatura (variação de $\pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$)
- Quantidade de ácido fórmico na fase móvel (variação de $\pm 0,1 \%$)
- Quantidade de metanol na fase móvel (variação de $\pm 1\%$)
- Quantidade de acetonitrila na fase móvel (variação de $\pm 0,1 \%$)
- Diferentes marcas e lotes de colunas

Um método só pode ser considerado robusto se os limites de precisão, exatidão e seletividade permaneceram dentro dos critérios de aceitação após as pequenas modificações. Dessa forma, em nossos ensaios, a resolução entre os picos cromatográficos foi utilizada na avaliação da seletividade, enquanto que o ensaio de recuperação, na avaliação da precisão e da exatidão do método. Além disso, o fator de cauda também foi avaliado para verificar o desempenho do método frente a cada mudança realizada.

As análises foram realizadas em sextuplicata, utilizando uma solução de trabalho contendo uma mistura de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cumarina, ácido o-cumárico, dihidrocumarina e siringaldeído. Ferramentas estatísticas como DPR%, intervalo de

confiança, teste *t* de Student e ANOVA (one way) foram empregadas para avaliar o comportamento dos dados após cada modificação realizada.

3.6 ANÁLISE POR CLAE-EM/EM

3.6.1 Preparo das soluções diluentes

As soluções diluentes utilizadas para análises no espectrômetro de massas variaram em sua composição de acordo com o tipo de análise e o modo de ionização de cada composto.

Para análises através de infusão direta, as soluções diluentes utilizadas foram acetonitrila/água 70:30 v/v (0,05% de ácido fórmico) para o modo de ionização positivo, e acetonitrila/água 70:30 v/v (5 mM de formiato de amônio) para o modo de ionização negativo.

Para injeções no modo FIA e em CLAE-EM/EM, a solução diluente utilizada foi uma mistura de acetonitrila/água 60:40 v/v. Portanto esta foi empregada no preparo das soluções de trabalho e nas diluições das formas farmacêuticas.

3.6.2 Preparo dos padrões

Para obtenção das soluções estoque, os padrões de cumarina, ácido *o*-cumarico, ácido caurenóico, siringaldeído, dihidrocumarina, 6-metilcumarina e prednisona foram analiticamente pesados e em seguida, dissolvidos separadamente em metanol de modo a obter uma concentração de 1,0 mg mL⁻¹ de cada composto.

Soluções de trabalho foram preparadas a partir de novas diluições das soluções estoque, sendo a composição da solução diluente variada de acordo com a necessidade de cada experimento, conforme descrito no item 3.6.1.

Antes das injeções todas as soluções foram filtradas através de filtro de seringa de PVDF (11 mm, 0.45 µm de poro, Millipore Millex). As soluções estoque e de trabalho foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C.

3.6.3 Preparo das amostras comerciais de xarope e de solução oral de guaco

As amostras de xarope e de solução oral de guaco foram diluídas primeiramente em água ultrapura e em seguida em solução diluente (item 3.6.1) de modo a obter uma concentração final de aproximadamente 50 ng mL⁻¹ de cumarina e 200 ng mL⁻¹ de ácido *o*-cumárico. O cálculo do fator de diluição de cada amostra foi realizado de acordo com os teores obtidos destes metabólitos no ensaio por CLAE-DAD. As etapas de preparo das formas farmacêuticas, de acordo com o modo de ionização de cada composto são descritas nas Tabelas 03 e 04.

TABELA 03 - PREPARO DAS AMOSTRAS DE XAROPE E DE SOLUÇÃO ORAL DE GUACO PARA DETERMINAÇÃO DA CUMARINA E DA DIHIDROCUMARINA ATRAVÉS DE CLAE- EM/EM (ESI+).

Amostra	Teor de cumarina ^a (µg mL ⁻¹)	Diluição em água (v/v)	Tomada de amostra (µL)	Balão volumétrico ^b (mL)	Padrão interno 6-metilcumarina (ng mL ⁻¹)	Teor de cumarina estimado (ng mL ⁻¹)
1	280,89	1:10	44,5	25	40	50,00
2	35,97	1:1	69,5	25	40	50,00
3	28,31	1:1	88,3	25	40	50,00
4	55,35	1:1	45,2	25	40	50,04
5	169,4	1:10	73,8	25	40	50,01
6	154,6	1:10	80,9	25	40	50,03
7	33,91	1:1	74,0	25	40	50,19
8	33,04	1:1	75,7	25	40	50,02
9	2,42	1:1	1040,0	25	40	49,92
10	23,21	1:1	110,0	25	40	51,06
11	2,3	1:5	2700,0	25	40	49,68
12	33,42	1:1	74,8	25	40	50,00

NOTA: ^aTeor de cumarina determinado através de CLAE-DAD; ^b Diluição realizada em solução diluente composta por acetonitrila/água 60:40 v/v.

TABELA 04 - PREPARO DAS AMOSTRAS DE XAROPE E DE SOLUÇÃO ORAL DE GUACO PARA DETERMINAÇÃO DO ÁC. O-CUMÁRICO, ÁC. CAURENÓICO E SIRINGALDEÍDO ATRAVÉS DE CLAE- EM/EM (ESI-).

Amostra	Teor de ác. o-cumárico ^a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Diluição em água (v/v)	Tomada de amostra (μL)	Balão volumétrico ^b (mL)	Padrão interno prednisona (ng mL^{-1})	Teor de ác. o-cumárico estimado (ng mL^{-1})
1	16,89	1:1	592,0	25	1000	199,98
2	3,45	1:1	2900,0	25	1000	200,10
3	7,84	1:1	1275,0	25	1000	199,92
4	9,56	1:1	1045,0	25	1000	199,80
5	23,73	1:1	421,0	25	1000	199,81
6	19,64	1:1	509,0	25	1000	199,94
7	5,79	1:1	1730,0	25	1000	200,33
8	Traços	1:1	3500,0	25	1000	-
9	Traços	1:1	3500,0	25	1000	-
10	4,79	1:1	2090,0	25	1000	200,22
11	2,14	1:1	4700,0	25	1000	201,16
12	13,92	1:1	720,0	25	1000	200,45

NOTA: ^aTeor de ácido o-cumárico determinado através de CLAE-DAD; ^b Diluição realizada em solução diluente composta por acetonitrila/água 60:40 v/v.

Todas as amostras foram filtradas em filtro de seringa PVDF (11 mm, 0.45 μm , Millipore Millex) antes da injeção.

3.6.4 Instrumentação

As análises no Espectrômetro de Massas foram realizadas em um triplo quadrupolo da Applied Biosystems modelo API 3200 equipado com bomba de infusão Havard 22 Apparatus e fonte de ionização por eletrospray (ESI). O sistema foi acoplado a um cromatógrafo líquido Agilent 1100, bomba quaternária G1311A, degaseificador G1379A e injetor automático CTC Waters 2777 Sample Manager. Os dados obtidos através de CLAE-EM/EM foram processados através do software Analyst, versão 1.4.2.

3.6.5 Desenvolvimento do método

3.6.5.1 Infusão direta no EM para checagem do sinal dos analitos

A checagem do sinal dos analitos foi realizada através de análise por injeção direta (infusão). Para realização deste experimento, soluções de trabalho contendo 100 ng mL⁻¹ de cumarina, ácido o-cumárico, dihidrocumarina, siringaldeído, ácido caurenóico, 6-metilcumarina e prednisona foram preparadas, separadamente, e infundidas no espectrômetro de massas, sendo o sinal de cada analito avaliado. Devido às diferentes características químicas de cada analito, e consequente ionização, as soluções diluentes utilizadas no preparo dos padrões variaram o agente modificador em sua composição conforme descrito no item 3.6.1.

ESI foi utilizado como fonte de ionização mantendo a posição do capilar em 10 mm na vertical e 5 mm na horizontal. As amostras foram infundidas através de seringa (Hamilton, Reno, NV, USA) em fluxo constante de 10 µL min⁻¹ sendo monitorada no modo positivo de ionização a cumarina, a dihidrocumarina e a 6-metilcumarina, e no modo negativo de ionização o ácido caurenóico, ácido o-cumárico, siringaldeído e a prednisona.

Para otimização dos parâmetros de *declustering potencial* (DP*), *entrance potencial* (EP), *collision cell entrance potencial* (CEP), *collision energy* (CE) e *cell exit potencial* (CXP), a concentração dos analitos foi variada a fim de atender as especificações do equipamento para otimização automática através de MRM (intensidade de sinal entre 2 x 10⁵ e 1x 10⁶ cps). Após as otimizações, foram adquiridos os dois fragmentos mais intensos de cada composto.

3.6.5.2 Análise por injeção em fluxo (FIA)

As otimizações dos parâmetros da fonte de ionização (*curtain gas* (CUR), *collision gas* (CAD), *nebulizer gas* (GS1), *turbo gas* (GS2), *ion spray voltage* (IS) e temperatura da fonte) foram realizadas através de análise por injeção em fluxo (FIA)

acoplando o CLAE sem coluna ao Espectrômetro de Massas. Neste ensaio, foi utilizado como fase móvel uma mistura de acetonitrila/água (50:50 v/v) contendo 0,05% de ácido fórmico ou 5 mM de formiato de amônio de acordo com as características de ionização dos compostos. O fluxo foi mantido em $200 \mu\text{L min}^{-1}$ e a posição do capilar em 3 mm na vertical e 5 mm na horizontal. O volume de injeção foi de $10 \mu\text{L}$.

3.6.5.3 Análise por CLAE-EM/EM

Para as otimizações com coluna, diferentes combinações de acetonitrila e água foram utilizadas para compor a fase móvel. Os aditivos foram mantidos em 0,05% de ácido fórmico no modo positivo de ionização e 5 mM de formiato de amônio no modo negativo de ionização. Diferentes marcas e diâmetros de colunas também foram avaliados (Zorbax Eclipse XDB C18 150 x 4,6 mm, $5\mu\text{m}$ - Agilent Technologies®; XBridge C18 150 x 4,6 mm e XBridge 150 x 2,1 mm, $5\mu\text{m}$ - Waters® Corporation). De acordo com o diâmetro de cada coluna, diferentes vazões de fluxo foram testados (150 a $800 \mu\text{L min}^{-1}$) sendo a posição do capilar variada entre 1 e 3 mm de acordo com a vazão.

A escolha do melhor sistema cromatográfico foi baseada no melhor perfil dos picos cromatográficos levando em consideração a intensidade de sinal e o tempo de corrida. A velocidade de aquisição dos dados (*Dwell time*) foi calculada em função do número de íons monitorado em cada modo de ionização.

3.6.6 Validação dos métodos de CLAE-EM/EM.

A validação dos métodos foi determinada segundo critérios descritos na Resolução – RE nº 899, de 29 de março de 2003, ANVISA, categoria I que dispõe sobre testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas, porém com modificações (BRASIL, 2003a).

Para o espectrômetro de massas o ensaio de robustez não é necessário devido aos parâmetros otimizados serem específicos de cada composto, ou seja, pequenas variações afetam a sensibilidade ou até mesmo implicam na perda de sinal dos analitos. Da mesma forma variações não devem ser realizadas no cromatógrafo líquido, pois pequenas modificações na proporção da fase móvel, fluxo e temperatura alteram sensivelmente a resposta individual de cada composto. Portanto, os ensaios realizados na validação dos métodos de CLAE-EM/EM foram: seletividade, linearidade, intervalo, precisão e exatidão. O limite de detecção não se faz necessário para métodos classificados na categoria I, porém o estudo foi realizado para obtenção de uma referência mínima de detecção em função da concentração de cada composto.

3.6.6.1 Seletividade

O parâmetro de seletividade foi avaliado através do método da comparação da matriz.

Para a realização deste ensaio matrizes de xarope e de solução oral isentas dos metabólitos de interesse foram diluídas inicialmente 1:1 v/v em água ultrapura. Em seguida, uma alíquota de 400 µL de cada solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, sendo o volume completado com solução diluente (acetonitrila/água, 60:40 v/v). As amostras foram filtradas em filtro de PVDF 0,45 µm de poro e injetadas em CLAE-EM/EM nos diferentes modos de ionização.

Em uma segunda etapa, padrões analíticos foram misturados e diluídos em solução diluente de modo a obter uma concentração conhecida de 50 ng mL⁻¹ de cumarina, 150 ng mL⁻¹ de dihidrocumarina, 40 ng mL⁻¹ de 6-metilcumarina, 200 ng mL⁻¹ de ácido o-cumárico, 200 ng mL⁻¹ de siringaldeído, 100 ng mL⁻¹ de ácido caurenóico e 1000 ng mL⁻¹ de prednisona. As soluções foram filtradas e injetadas em CLAE-EM/EM nos diferentes modos de ionização.

Os cromatogramas obtidos com as matrizes isentas dos metabólitos de interesse, nos diferentes modos de ionização, foram sobrepostos a aqueles obtidos com padrões analíticos. Nenhum pico de interferência significativa deve ser

observado no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse ou do padrão interno.

3.6.6.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

LD e LQ foram estimados a partir da relação sinal/ruído e para isso soluções de trabalho contendo 1000 ng mL^{-1} de cumarina, ácido o-cumárico, ácido caurenóico, siringaldeído e dihidrocumarina foram diluídas de forma seriada em concentrações decrescentes até o menor pico detectável. As diluições foram realizadas em triplicata através do uso de uma solução diluente composta por acetonitrila/água nas proporções de 60:40 v/v.

Devido às características individuais de ionização de cada composto, cumarina e dihidrocumarina foram injetadas em CLAE-EM/EM no modo de ionização positivo enquanto que ácido caurenóico, ácido o-cumárico e siringaldeído no modo de ionização negativo. O preparo das soluções para o estudo do LD e do LQ é apresentado na tabela abaixo.

TABELA 5 – ESQUEMA PARA O PREPARO DAS SOLUÇÕES DE CUMARINA, ÁCIDO O-CUMÁRICO, ÁCIDO CAURENÓICO, DIHIDROCUMARINA E SIRINGALDEÍDO PARA ESTUDO DO LIMITE DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO EM CLAE-EM/EM.

Solução de trabalho: 1000 ng mL^{-1}							
Volume da solução de trabalho (mL)	0,25	0,1	0,05	0,025	0,025	0,025	0,025
Balão volumétrico (mL)	10	10	10	10	25	50	100
Concentração final de cada composto (ng mL^{-1})	25	10	5	2,5	1,0	0,5	0,25

O LD foi obtido através da menor concentração que resultou em um pico de três vezes o ruído da linha de base, e o LQ como a menor concentração ao qual

resultou em um sinal/ruído maior que 10, com precisão e exatidão dentro dos limites aceitáveis.

3.6.6.3 Linearidade e intervalo

A linearidade foi determinada através do método da padronização interna em uma faixa de concentração de 1,25 a 400 ng mL⁻¹ para cumarina, 12,5 a 600 ng mL⁻¹ para dihidrocumarina, 5 a 250 ng mL⁻¹ para o ácido caurenóico e 25 a 500 ng mL⁻¹ para siringaldeído e ácido *o*-cumárico.

Para a obtenção das curvas analíticas no modo positivo de ionização soluções estoque de cumarina e dihidrocumarina (1 mg mL⁻¹) foram misturadas e diluídas sucessivamente em acetonitrila/água (60:40 v/v), adicionando em cada ponto da curva 40 ng mL⁻¹ do padrão interno 6-metilcumarina. O mesmo procedimento foi realizado para os compostos ácido caurenóico, ácido *o*-cumárico e siringaldeído no modo negativo de ionização, no entanto com a adição de 1000 ng mL⁻¹ do padrão interno prednisona. As curvas de calibração foram realizadas em nove níveis de concentração, em triplicata, totalizando dessa forma 27 pontos de leitura.

O intervalo de trabalho foi definido através dos níveis mínimos e máximos de concentração onde foi possível determinar as substâncias de interesse com melhor precisão e exatidão. As elaborações das curvas de calibração em cada modo de ionização são descritas nas Tabelas 6 e 7.

TABELA 6 – ESQUEMA DE DILUIÇÃO PARA O PREPARO DAS SOLUÇÕES DOS METABÓLITOS DO GUACO PARA O ENSAIO DE LINEARIDADE EM CLAE-EM/EM (ESI+).

Solução de trabalho contendo a mistura de cumarina, dihidrocumarina e 6-metilcumarina (1000 ng mL⁻¹ de cada composto)							
Níveis de concentração	Volume da solução de trabalho (mL)			Diluição (acetonitrila/água 60:40 v/v)	Concentração final (ng mL ⁻¹)		
	CM	DH	MC	Balão volumétrico (mL)	CM	DH	MC
Nível 1	0,0313	0,315	1,0	25	1,25	12,5	40
Nível 2	0,025	0,25	0,4	10	2,5	25	40
Nível 3	0,05	0,50	0,4	10	5	50	40
Nível 4	0,05	0,375	0,2	5	10	75	40
Nível 5	0,125	0,50	0,2	5	25	100	40
Nível 6	0,25	0,75	0,2	5	50	150	40
Nível 7	0,5	1,0	0,2	5	100	200	40
Nível 8	1,0	2,0	0,2	5	200	400	40
Nível 9	2,0	3,0	0,2	5	400	600	40

NOTA: CM: Cumarina; DH: Dihidrocumarina; MC: Padrão interno 6-metilcumarina.

TABELA 7 – ESQUEMA DE DILUIÇÃO PARA O PREPARO DAS SOLUÇÕES DOS METABÓLITOS DO GUACO PARA O ENSAIO DE LINEARIDADE EM CLAE-EM/EM (ESI-).

Solução de trabalho contendo uma mistura de ác. o-cumárico, ác. caurenóico, siringaldeído e prednisona (1000 ng mL⁻¹ de cada composto)									
Níveis de concentração	Volume da solução de trabalho (μL)				Diluição (acetonitrila/água 60:40 v/v)	Concentração final (ng mL ⁻¹)			
	OC	SI	AC	PR	Balão volumétrico (mL)	OC	SI	AC	PR
Nível 1	25	25	5	1000	10	25	25	5	1000
Nível 2	50	50	10	1000	10	50	50	10	1000
Nível 3	75	75	25	1000	10	75	75	25	1000
Nível 4	100	100	50	1000	10	100	100	50	1000
Nível 5	150	150	75	1000	10	150	150	75	1000
Nível 6	200	200	100	1000	10	200	200	100	1000
Nível 7	300	300	150	1000	10	300	300	150	1000
Nível 8	400	400	200	1000	10	400	400	200	1000
Nível 9	500	500	250	1000	10	500	500	250	1000

NOTA: OC: ácido o-cumárico; SI: siringaldeído; AC: ácido caurenóico; PR: Padrão interno prednisona.

3.6.6.4 Precisão

A precisão do método foi determinada em dois níveis: repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia).

O ensaio de repetibilidade consistiu na avaliação de uma série de medidas realizadas em uma mesma amostra durante um curto período de tempo de um mesmo dia. Para realizar este ensaio, soluções de trabalho foram preparadas em triplicata em único nível de concentração para os padrões internos, e em três níveis de concentração para os padrões externos, conforme demonstrado na Tabela 8. O ensaio foi realizado pelo mesmo analista em um mesmo equipamento em condições idênticas de uso. A dispersão dos resultados foi avaliada através do coeficiente de variação (CV%).

A precisão intermediária foi determinada por um segundo analista nos mesmos níveis de concentração da repetibilidade após dois dias deste ensaio. O mesmo tratamento matemático da repetibilidade foi utilizado na comparação das áreas obtidas entre os dois analistas.

TABELA 8 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO UTILIZADOS PARA O ENSAIO DE PRECISÃO.

Analitos	Modo de ionização	Níveis de concentração (ng mL ⁻¹)		
		Nível 1	Nível 2	Nível 3
Cumarina	Positivo	5,0	50	200
Dihidrocumarina		25	100	200
6-metilcumarina*		40	40	40
Ácido o-cumárico	Negativo	75	200	400
Siringaldeído		75	200	400
Ácido caurenóico		25	100	200
Prednisona*		1000	1000	1000

NOTA: *Padrão interno

3.6.6.5 Exatidão

A exatidão dos métodos foi determinada através da porcentagem de erro relativo entre as áreas teóricas e as experimentais de cada analito. Os ensaios foram realizados em sextuplicata através do método da adição do padrão sendo dessa forma avaliadas as áreas recuperadas de cada analito após a fortificação de uma dada matriz.

Para obtenção dos valores teóricos, soluções de trabalho foram preparadas em um único nível de concentração para os padrões internos, e em três níveis de concentração para os padrões externos, conforme descrito nas Tabelas 09 e 10. As soluções foram injetadas em CLAE-EM/EM sendo as áreas obtidas de cada analito, em cada nível de concentração, consideradas como teóricas.

Para obter os valores experimentais inicialmente foi necessário conhecer as áreas de cada analito presentes na matriz de trabalho. Para tanto uma amostra de escolha foi preparada de acordo com as diluições propostas nas Tabelas 9 e 10 para cada modo de ionização. Após o preparo, as matrizes foram injetadas em CLAE-EM/EM sendo as áreas obtidas de cada composto, em cada modo de ionização, registradas. Em seguida as matrizes foram fortificadas com soluções de trabalho nos mesmos níveis de concentração do ensaio teórico. Os valores experimentais foram calculados subtraindo as áreas obtidas nas amostras sem fortificação, daquelas obtidas na amostra fortificada.

De posse das áreas teóricas e das áreas experimentais, a porcentagem de recuperação pôde ser calculada através da equação:

$$E(\%) = \frac{\text{Área experimental}}{\text{Área teórica}} \times 100$$

Os resultados foram tratados estatisticamente através do coeficiente de variação e do intervalo de confiança no nível de 95%.

TABELA 9 - PREPARO DA AMOSTRA DE SOLUÇÃO ORAL COM DIFERENTES NÍVEIS DE FORTIFICAÇÃO PARA OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EXPERIMENTAL PARA O ENSAIO DE EXATIDÃO (ESI+).

Modo positivo de ionização						
Preparo da amostra (solução oral)			Níveis de fortificação	Compostos (ng mL ⁻¹)		
Diluição 1	Alíquota	Diluição 2		Cumarina	Dihidrocumarina	6-metilcumarina
1:10 v/v	41,8 µL	25 mL em	1	5,0	25	40
em água		solução	2	50	100	40
ultrapura		diluyente*	3	200	200	40

NOTA: Solução diluyente composta por acetonitrila/água 60:40 v/v; n=6.

TABELA 10 - PREPARO DA AMOSTRA DE SOLUÇÃO ORAL COM DIFERENTES NÍVEIS DE FORTIFICAÇÃO PARA OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EXPERIMENTAL PARA O ENSAIO DE EXATIDÃO (ESI-).

Modo negativo de ionização							
Preparo da amostra			Níveis de fortificação	Compostos (ng mL ⁻¹)			
Diluição 1	Alíquota	Diluição 2		Ác. o-cumárico	Siringaldeído	Ácido caurenóico	Prednisona
1:1 v/v	100 µL	25 mL	1	75	75	25	1000
em água		em	2	200	200	100	1000
ultrapura		solução diluyente*	3	400	400	200	1000

NOTA: Solução diluyente composta por acetonitrila/água 60:40 v/v; n=6.

3.6.6.6 Teste de estabilidade das soluções padrão

O teste de estabilidade das soluções padrão foi avaliado comparando-se as áreas dos compostos em amostras recém-preparadas, com as áreas obtidas após um período de 12 horas em temperatura controlada entre 21 e 23 °C (curta duração),

30 dias de armazenamento sob refrigeração a 4 °C (longa duração) e 24 horas de armazenamento no gerenciador de amostras à 20 °C .

O ensaio foi realizado através de injeções de uma sextuplicata de soluções de trabalho nas concentrações de 5, 50 e 200 ng mL⁻¹ de cumarina; 25, 100 e 200 ng mL⁻¹ de dihidrocumarina; 25, 100 e 200 ng mL⁻¹ de ácido caurenóico; 75, 200 e 400 ng mL⁻¹ de ácido o-cumárico e siringaldeído; 40 ng mL⁻¹ de 6-metilcumarina e 1000 ng mL⁻¹ de prednisona. O preparo das soluções de trabalho foi realizado através do uso de solução diluente adequada, conforme descrito no item 3.6.1. Os resultados foram expressos através do coeficiente de variação e na porcentagem de recuperação de cada analito.

3.6.7 Determinação via CLAE-EM/EM dos metabólitos secundários do guaco nas amostras de xarope e solução oral

3.6.7.1 Modo de ionização positivo

Os metabólitos cumarina e dihidrocumarina foram determinados nas amostras de xarope e de solução oral nas seguintes condições:

- Pré-coluna: XBridge C18 10 x 2,1mm, 5µm de partícula (Waters Corporation®)
- Coluna: XBridge C18 150 x 2,1mm, 5µm de partícula (Waters Corporation®)
- Temperatura de forno: 25 °C.
- Volume de injeção: 10 µL
- Fase móvel: Água e acetonitrila contendo 0,05% de ac. fórmico
- Modo de eluição: Gradiente.

As fases móveis foram filtradas separadamente através de membrana de PTFE 0,45 µm (Millipore, Molsheim, France). O gradiente de eluição encontra-se

disposto no Quadro 4 enquanto que os parâmetros individuais de cada composto no Quadro 5.

Modo de ionização positivo			
Parâmetros			
Tempo (min)	Fluxo ($\mu\text{L min}^{-1}$)	Á(%)	B (%)
0.00	200	30	70
2.00	200	30	70
2.10	200	10	90
5.00	200	10	90
5.10	200	30	70
10.00	200	30	70

QUADRO 4 - GRADIENTE UTILIZADO EM CLAE-EM/EM PARA QUANTIFICAÇÃO DA CUMARINA E DA DIHIDROCUMARINA.

NOTA: A: Água ultrapura (0,05% ácido fórmico); B: Acetonitrila (0,05% ácido fórmico)

Parâmetros	Compostos [M+H] ⁺					
	Cumarina (147,3)		Dihidrocumarina (149,14)		6-metilcumarina* (161,04)	
	Fragmentos monitorados (m/z)					
	91,0	103,10	121,10	93,10	105,20	77,10
CE	31	25	20	25	27	45
CXP	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
CEP	12		8,5		10	
DP	36		76		61	
EP	8		11		11,5	

QUADRO 5: PARÂMETROS OTIMIZADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA DETERMINAÇÃO DA CUMARINA E DA DIHIDROCUMARINA.

DADOS: Parâmetros da fonte: *Curtain gas* (CUR): 10; *Collision gas* (CAD): 6; *Ion spray voltage* (IS): 5000 V; *Nebulizer gas* (GS1): 40; *Turbo gas* (GS2): 40; Temperatura da fonte: 450 °C. Velocidade de aquisição dos dados: 200 msec.

NOTA: *Padrão interno; CE (*Collision energy*); CXP (*Cell exit potencial*); DP* (*Declustering potencial*); EP (*Entrance potencial*) CEP (*Collision cell entrance potencial*).

3.6.7.2 Modo de ionização negativo

Os metabólitos ácido *o*-cumárico, ácido caurenóico e siringaldeído foram determinados nas amostras de xarope e de solução oral nas seguintes condições:

- Pré-coluna: XBridge C18 10 x 2,1mm, 5µm de partícula (Waters Corporation®)
- Coluna: XBridge C18 150 x 2,1mm, 5µm de partícula (Waters Corporation®)
- Temperatura de forno: 25 °C.
- Volume de injeção: 10 µL
- Fase móvel: Água e solução acetonitrila/água 97:3 v/v (5mM de formiato de amônio)
- Modo de eluição: Gradiente

As fases móveis foram filtradas separadamente através de membrana de PTFE 0,45 µm (Millipore, Molsheim, France). O gradiente de eluição encontra-se disposto no Quadro 6 enquanto que os parâmetros individuais de cada composto no Quadro 7.

Modo de ionização negativo			
Parâmetros			
Tempo (min)	Fluxo (µL min ⁻¹)	A%	B (%)
0,00	220	65	35
0,30	220	65	35
0,50	220	5	95
6,00	220	5	95
6,10	220	65	35
14,00	220	65	35

QUADRO 6 - GRADIENTE UTILIZADO EM CLAE-EM/EM PARA QUANTIFICAÇÃO DO ÁC. O-CUMARICO, ÁCIDO CAURENÓICO E SIRINGALDEÍDO.

NOTA: A: Água ultrapura (5mM formiato de amônio); B: Solução acetonitrila/água 97:3 v/v (5mM formiato de amônio)

Parâmetros	Compostos [M-H] ⁺						
	Ác. o-cumárico (162,90)		Siringaldeído (180,84)		Ác. Caurenoíco (301,10)	Prednisona* (357,02)	
	Fragmentos monitorados (m/z)						
	119,0	93,1	166,0	151,0	301,1	327,0	299,0
CE	-18	-30	-20	-26	-10	-15	-15
CXP	0,0	0,0	-4	0,0	-4	-4	-4
CEP	-10		-14		-22	-18	
DP	-25		-50		-70	-25	
EP	-5		-3		-5	-6,5	

QUADRO 7 - PARÂMETROS OTIMIZADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO O-CUMÁRICO, SIRINGALDEÍDO E ÁCIDO CAURENÓICO.

DADOS: Parâmetros da fonte: *Curtain gas* (CUR): 18; *Collision gas* (CAD): 6; *Ion spray voltage* (IS): -4500 V; *Nebulizer gas* (GS1): 50; *Turbo gas* (GS2): 50; Temperatura da fonte: 550 °C. Velocidade de aquisição dos dados: 180 msec.

NOTA: *Padrão interno; CE (*Collision energy*); CXP (*Cell exit potencial*); DP* (*Declustering potencial*); EP (*Entrance potencial*) CEP (*Collision cell entrance potencial*).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES ATRAVÉS DE CLAE-DAD

4.1.1 Espectroscopia de ultravioleta

A primeira etapa para o desenvolvimento do método através de CLAE-DAD foi verificar o comprimento de onda ideal para detecção dos compostos. Para tanto, soluções de trabalho de cumarina ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$), ácido *o*-cumárico ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$), siringaldeído ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$), dihidrocumarina ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) e ácido caurenóico ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram submetidas à varredura em luz ultravioleta de 200 a 400 nm. Os espectros de absorção foram obtidos e encontram-se disponibilizados nas Figuras 2, 3, 4, 5 e 6.

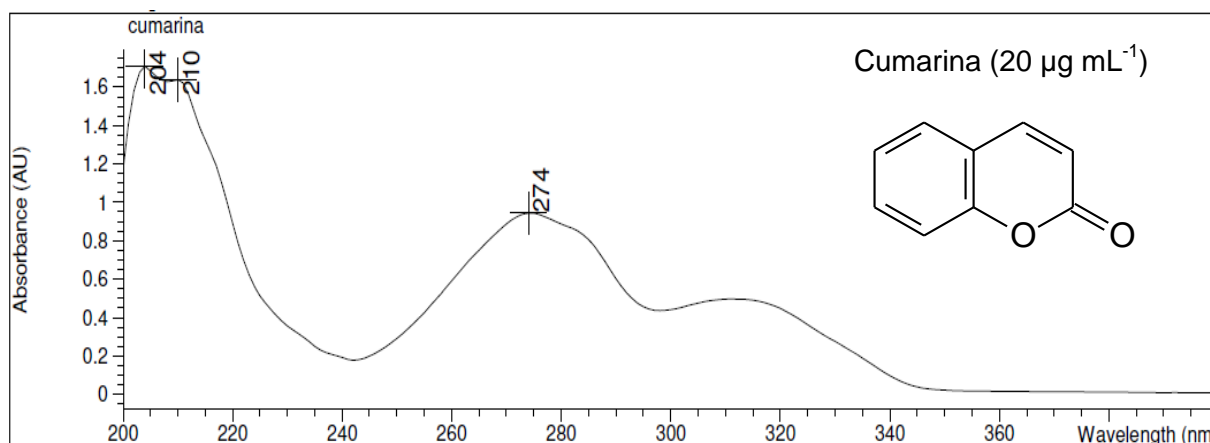


FIGURA 2 - ESPECTRO DE VARREDURA NO UV DE UMA SOLUÇÃO ETANÓLICA DE CUMARINA.

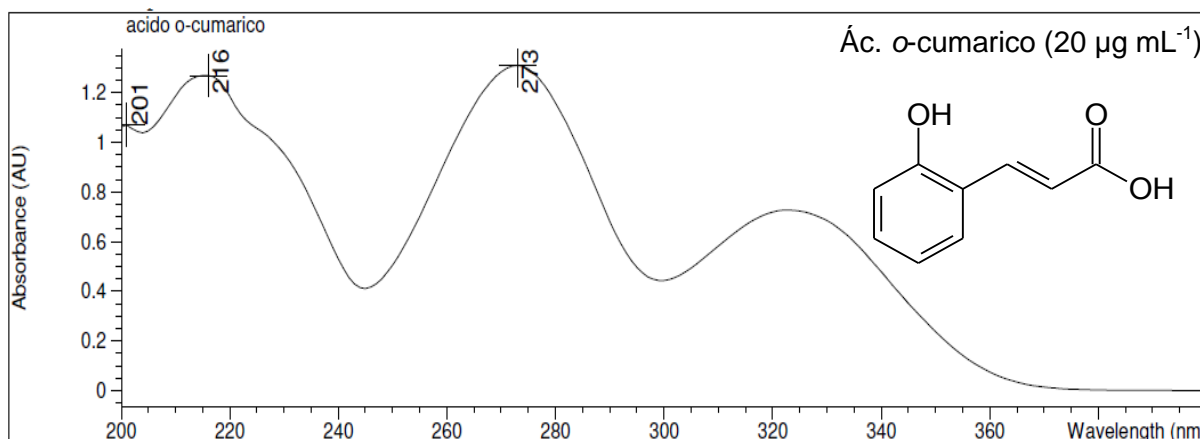


FIGURA 3 - ESPECTRO DE VARREDURA NO UV DE UMA SOLUÇÃO ETANÓLICA DE ÁC. O-CUMÁRICO.

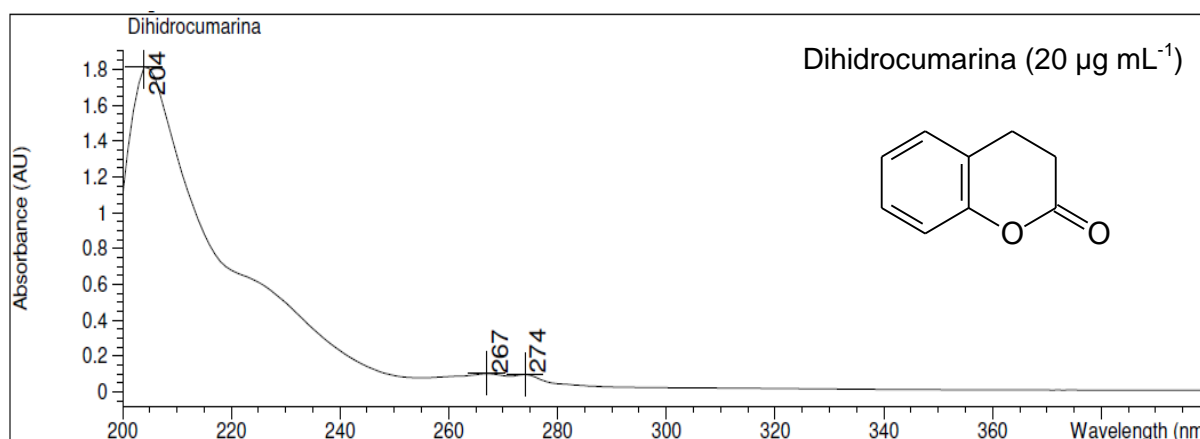


FIGURA 4 - ESPECTRO DE VARREDURA NO UV DE UMA SOLUÇÃO ETANÓLICA DE DIHIDROCUMARINA.

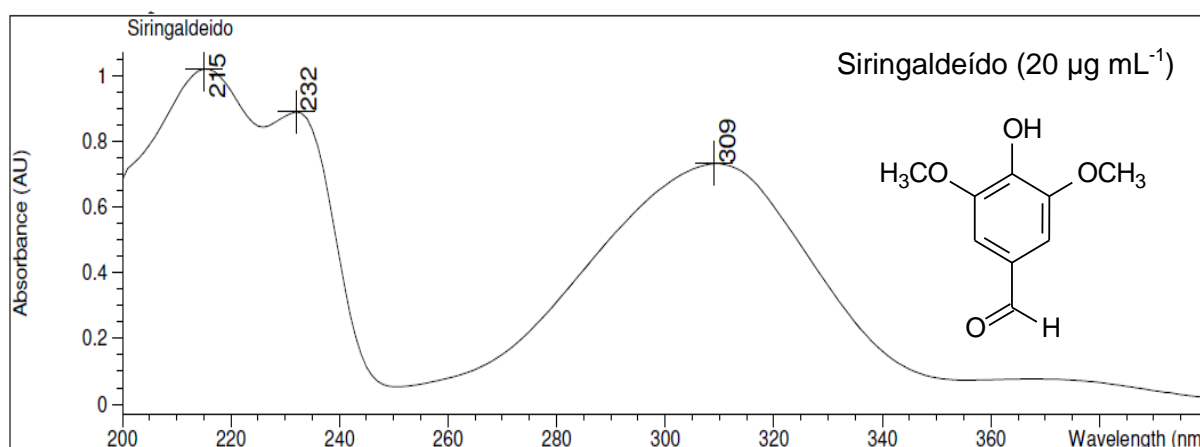


FIGURA 5 - ESPECTRO DE VARREDURA NO UV DE UMA SOLUÇÃO ETANÓLICA DE SIRINGALDEÍDO.

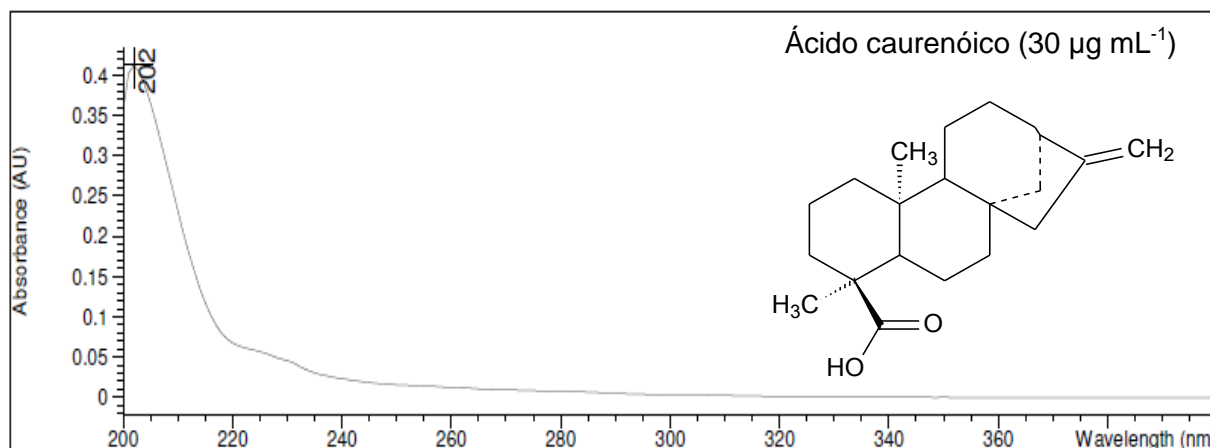


FIGURA 6 - ESPECTRO DE VARREDURA NO UV DE UMA SOLUÇÃO ETANÓLICA DE ÁC. CAURENÓICO.

Na avaliação dos espectros obtidos, os compostos cumarina, ácido *o*-cumárico, dihidrocumarina e siringaldeído apresentaram absorção satisfatória no ultravioleta (UV). O ácido caurenóico por sua vez, apresentou baixa intensidade de absorção em comprimentos de onda mais seletivos, mesmo sendo sua concentração de leitura 50% maior que os demais compostos. Esse analito não possui um bom cromóforo em sua estrutura molecular (Figura 6), o que dificulta sua detecção no ultravioleta. Em virtude disso, apenas a cumarina, o ácido *o*-cumárico, a dihidrocumarina e o siringaldeído foram monitorados através de CLAE-DAD.

Através dos espectros de absorção de UV também foi possível verificar uma absorvidade expressivamente menor da dihidrocumarina quando comparada aos demais metabólitos. Este composto possui em sua estrutura molecular apenas um anel ressonante (Figura 4), enquanto que a cumarina, o ácido *o*-cumárico e o siringaldeído uma dupla conjugada a mais (Figuras 02, 03 e 05), fazendo com que a intensidade de absorção aumente significativamente.

A próxima etapa de nosso experimento foi a sobreposição das bandas de absorção no ultravioleta destes compostos a fim de verificar a possibilidade de otimização da leitura através de um comprimento de onda único (Figura 7).

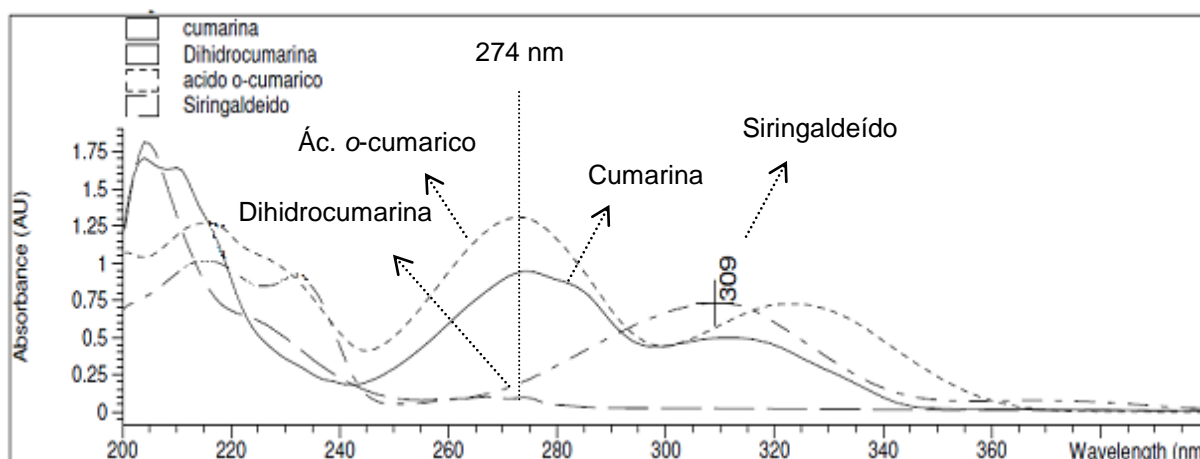


FIGURA 7 – SOBREPOSIÇÃO DOS ESPECTROS DE VARREDURA NO UV DA CUMARINA, DA DIHIDROCUMARINA, DO ÁCIDO O-CUMÁRICO E DO SIRINGALDEÍDO.

De acordo com a Figura 7, a sobreposição dos espectros demonstrou a possibilidade de utilização de um único comprimento de onda para monitorar todos os compostos. O sirringaldeído, apesar de a absorvidade máxima ter sido no comprimento de onda de 309 nm, teve boa sensibilidade no mesmo comprimento de onda das cumarinas e do ácido o-cumárico. Portanto, o comprimento de onda utilizado para monitorar todos os compostos foi o de 274 nm.

Outra consideração a ser feita quanto a sobreposição dos espectros, é que no comprimento de onda de 230 nm, os compostos dihidrocumarina e sirringaldeído têm uma maior absorvidade e por consequência uma maior sensibilidade. No entanto, neste comprimento de onda existe uma perda considerável na sensibilidade do ácido o-cumárico e da cumarina, sendo este último o principal metabólito relacionado aos efeitos terapêuticos do guaco.

4.1.2 Desenvolvimento do método

4.1.2.1 Escolha da coluna

Para o desenvolvimento do método, inicialmente um levantamento bibliográfico foi realizado para verificação dos outros métodos existentes por CLAE aos quais envolvesse de alguma forma a identificação, isolamento ou quantificação dos metabólitos secundários de *M. glomerata* e *M. laevigata*. A partir dos dados

obtidos através desse levantamento, verificou-se que a coluna de separação mais utilizada para esses fins é a de fase reversa, composta por grupos de octadecilsilano (C18) (CELEGHINI, 1999; ABOY *et al.*, 2000; CABRAL; DOS SANTOS; ALHAIQUE, 2001; CELEGHINI, 2001; CELEGHINI; VILEGAS; LANÇAS, 2001; BIAVATTI *et al.*, 2004; MAIORANO *et al.*, 2005; SANTOS, 2005; BRASIL, 2005; PEREGRINO; LEITÃO, 2005; BERTOLUCCI *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2008).

Além do recheio, também foi verificado as dimensões mais adequadas da coluna para o início das atividades. De acordo com Snyder e colaboradores (1997), colunas com tamanho de 150 mm de comprimento e 5 µm de diâmetro de partícula, são de boa escolha para o início do desenvolvimento de um novo método, pois apresentam boa relação entre eficiência cromatográfica e tempo de análise (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). Nesse sentido, a primeira escolha para o início de nossas atividades foi uma coluna Zorbax Eclipse XDB C18 150 x 4.6 mm 5 µm de partícula (Agilent Technologies®). Isso porque essa coluna possui uma alta eficiência de separação sendo além de tudo composta em seu substrato de sílica ultrapura desativada com duplo *Endcapped* o que cobre o maior número possível de silanóis ativos evitando, portanto, problemas como o aumento do fator de cauda dos picos cromatográficos.

Definida a coluna, a próxima etapa foi o desenvolvimento do método. Para tanto padrões analíticos de cumarina, ácido o-cumárico, dihidrocumarina e siringaldeído foram utilizados. Além disso, considerou-se também uma amostra de fitoterápico para o desenvolvimento, sendo dessa forma, a amostra 1(um) escolhida como referência, pois esta possui um valor declarado 10 vezes maior de cumarina que as demais amostras, e em consequência disto, uma maior concentração de outros metabólitos que compõe o extrato.

4.1.2.2 Composição da fase móvel

Para a escolha da melhor composição da fase móvel, dois fatores foram levados em consideração: o melhor perfil de separação entre os picos cromatográficos e o melhor custo benefício. Para tanto, os primeiros ensaios se deram através de uma fase móvel composta por uma mistura de água/metanol nas proporções de 60:40 v/v.

Nas primeiras injeções foi verificado um fator de cauda elevado para as cumarinas ($\approx 1,5$) o que poderia dificultar a reprodutibilidade das análises quando da aplicabilidade do método. De acordo com Stöckigt e colaboradores, esse problema pode ser facilmente eliminado acidificando a fase móvel, de modo que o ácido adicionado possa competir com o analito na interação com o oxigênio livre dos grupos silanóis (STÖCKIGT *et al.*, 2002). Nesse sentido, o ácido fórmico na concentração de 1% foi nossa primeira escolha para compor a fase móvel devido ao fato de ser um ácido fraco comumente utilizado para essa finalidade. Após a adição de ácido fórmico na composição da fase móvel, as amostras foram reinjetadas sendo verificada uma melhora significativa no fator de cauda para todos os compostos ($\approx 1,0$).

Em seguida, diversas proporções entre água e metanol (80:20 até 60:40 v/v) foram testadas na composição da fase móvel, sendo observado em todas as etapas de modificações, o perfil cromatográfico da amostra. Os cromatogramas utilizando diferentes proporções de água e metanol na composição da fase móvel são apresentados na Figura 8.

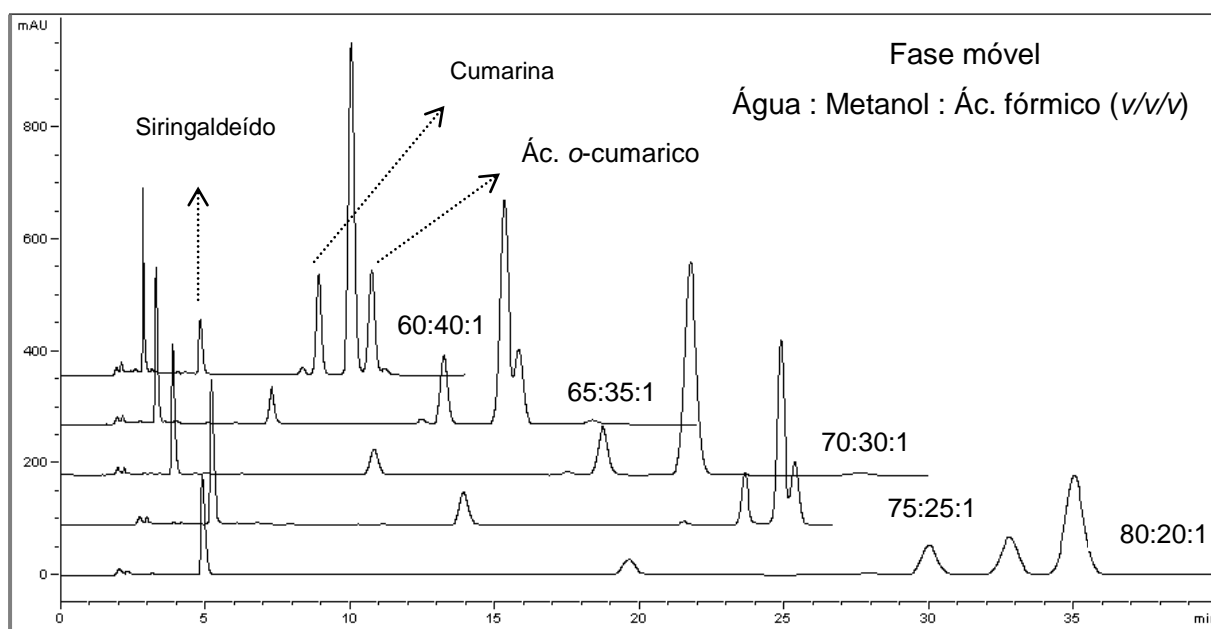


FIGURA 8 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA SOLUÇÃO ORAL DE GUACO (AMOSTRA 1) UTILIZANDO DIFERENTES PROPORÇÕES DE ÁGUA E METANOL NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.

NOTA: Condições de análise: fluxo: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$; eluição isocrática; volume de injeção: $20 \text{ }\mu\text{l}$; temperatura de forno: $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; detecção: 274 nm .

Conforme demonstrado na Figura 8, a melhor correlação entre tempo de corrida e separação dos compostos estaria entre 60:40 e 70:30 v/v (água/metanol), não sendo detectado nestas condições pico correspondente a dihidrocurarina. Em virtude disso a amostra foi fortificada com $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada composto, sendo verificado através dessa experiência, que o pico anteriormente relacionado ao siringaldeído, de fato, é um composto desconhecido ao qual possui um tempo eluição semelhante ao do metabólito de interesse (Figura 9). A co-eluição entre o siringaldeído e este composto desconhecido é melhor evidenciada quando a proporção de água é aumentada na fase móvel.

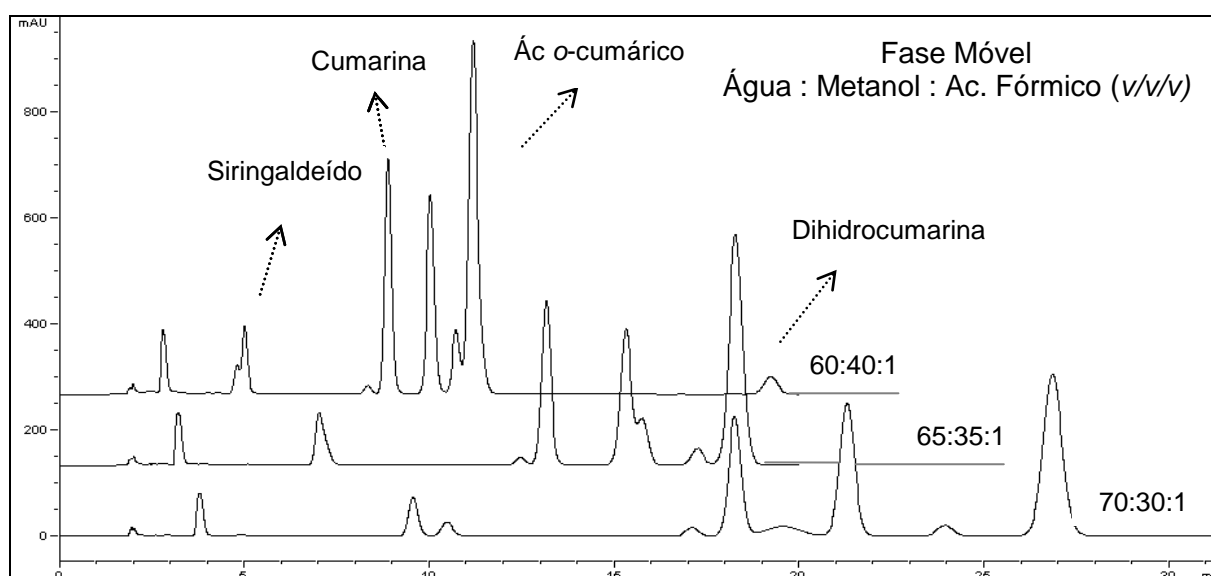


FIGURA 9 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA SOLUÇÃO ORAL DE GUACO (AMOSTRA 1) FORTIFICADA COM $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ DE CUMARINA, ÁC. O-CUMÁRICO, DIHIDROCUMARINA E SIRINGALDEÍDO UTILIZANDO DIFERENTES PROPORÇÕES DE ÁGUA E METANOL NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.

NOTA: Condições de análise: fluxo: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$; eluição isocrática; temperatura de forno: 25°C ; detecção: 274 nm ; volume de injeção: $20 \mu\text{L}$.

De acordo com os cromatogramas obtidos na Figura 9, a única mistura entre água e metanol ao qual compunha uma fase móvel com separação otimizada entre os compostos de interesse, foi na proporção de 70:30 v/v (água/metanol), porém, com a ressalva quanto ao tempo de corrida ao qual ficou extenso sendo inviável sua utilização em rotinas comuns de quantificação. Para tanto seria necessário utilizar um solvente orgânico ao qual aumentasse a velocidade de eluição dos compostos sem proporcionar mudanças bruscas de polaridade na fase móvel.

Dessa forma, pequenas quantidades de acetonitrila foram incorporadas na fase móvel, sendo retiradas iguais proporções de água. A acetonitrila possui polaridade próxima a do metanol, porém com um valor eluotrópico três vezes maior, ou seja, pequenas quantidades adicionadas modificariam sensivelmente a velocidade de eluição dos compostos sem alterar significativamente a polaridade da fase móvel (Quadro 8). Os cromatogramas obtidos com diferentes proporções de acetonitrila na composição da fase móvel são apresentados na Figura 10:

QUADRO 8 - PROPRIEDADES DOS SOLVENTES UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO.

Solventes	Polaridade	Valor eluotrópico em cromatografia de fase reversa
Água	10.2	-
Metanol	5.1	1.0
Acetonitrila	5.8	3.1

Fonte: SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997.

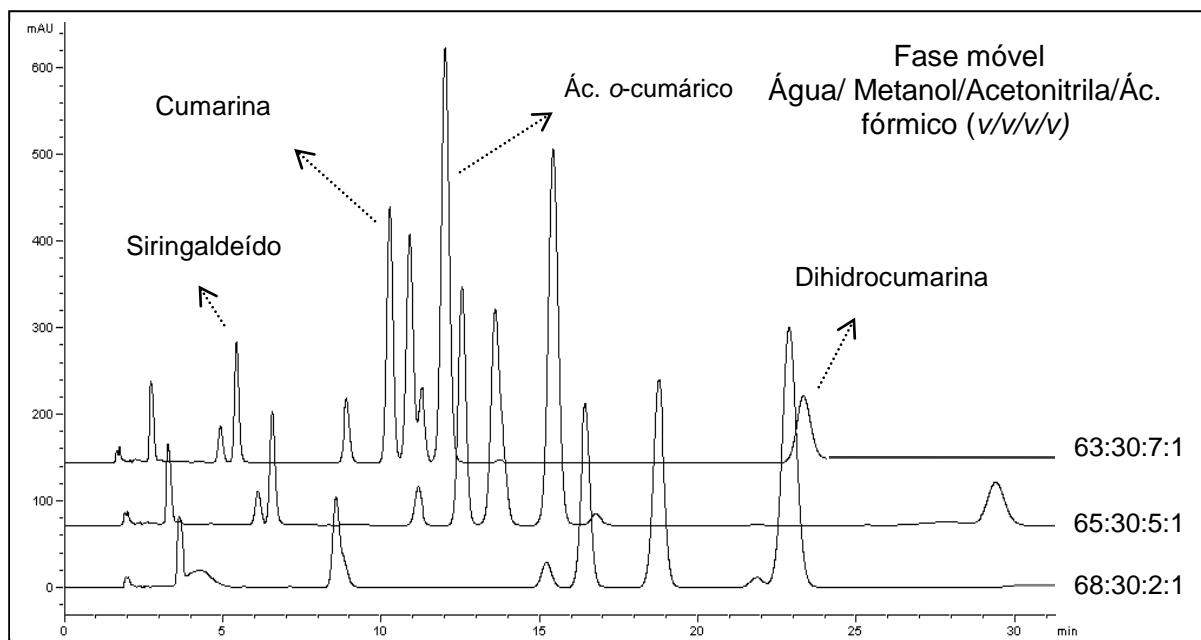


FIGURA 10 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA SOLUÇÃO ORAL DE GUACO (AMOSTRA 1) FORTIFICADA COM $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ DE CUMARINA, ÁC. O-CUMÁRICO, DIHIDROCUMARINA E SIRINGALDEÍDO UTILIZANDO DIFERENTES PROPORÇÕES DE ÁGUA, METANOL E ACETONITRILA NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.

NOTA: Condições cromatográficas: fluxo: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$; eluição isocrática; temperatura de forno: 25°C ; detecção: 274 nm ; volume de injeção: $20 \mu\text{L}$.

Conforme verificado nos cromatogramas acima, a adição de acetonitrila na fase móvel melhorou consideravelmente a separação cromatográfica do siringaldeído. Além de tudo diminuiu o tempo de eluição da dihidrocurmarina e, portanto o tempo de corrida. Neste contexto, a adição de 7% de acetonitrila na fase móvel seria a mais adequada se não fosse a perda de resolução da curmarina frente a outros compostos detectados na amostra. Em analogia ao cromatograma, pequenas variações possíveis de ocorrer na fase móvel, poderiam fazer com que a curmarina co-eluisse com estes compostos, comprometendo dessa forma a análise.

Deste modo, a adição de 5% de acetonitrila na fase móvel foi a mais adequada, pois apesar do ligeiro aumento no tempo de corrida frente à adição de 7%, manteve uma excelente resolução entre os picos cromatográficos. Portanto, a fase móvel de escolha foi a composta por água/ metanol/acetonitrila/ácido fórmico nas proporções de 65:30:5:1, v/v/v/v.

4.1.2.3 Fluxo

Para fins de avaliar a possibilidade de uma diminuição ainda maior do tempo de corrida, diferentes vazões de fluxo foram testadas. O critério de escolha do melhor fluxo para compor o método em desenvolvimento foi a correlação tempo de corrida versus resolução dos picos cromatográficos. Os resultados encontram-se dispostos na Figura 11:

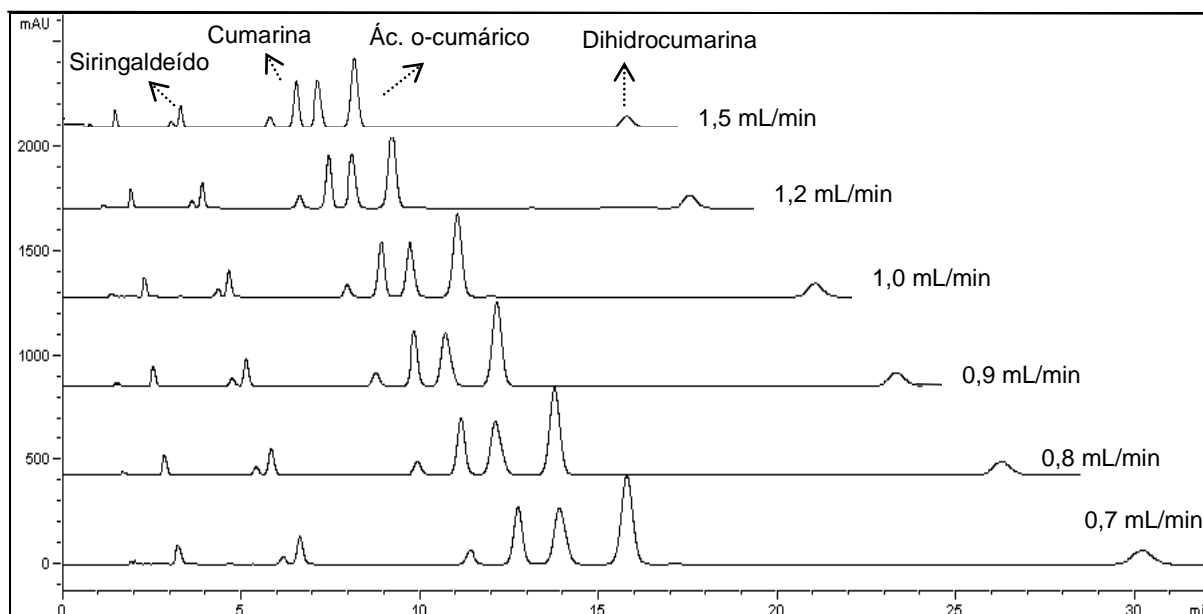


FIGURA 11 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-DAD UTILIZANDO DIFERENTES VAZÕES DE FLUXO.

NOTA: Fase móvel: água/metanol/acetonitrila/ácido fórmico (65:30:5:1, v/v/v/v); eluição isocrática; temperatura de forno: 25 °C; detecção: 274 nm; volume de injeção: 20 µl. Amostra utilizada: Solução oral de guaco (amostra 1) fortificada com 25 µg mL⁻¹ de cada metabólito (cumarina, ác. o-cumárico, dihidrocumarina e siringaldeído).

Em análise aos resultados obtidos, pode-se constatar que, o aumento no fluxo diminuiu a retenção relativa entre os picos cromatográficos, mas em contrapartida não alterou de forma significativa a resolução entre eles. O aumento do fluxo também favoreceu na melhora da simetria dos picos, e na diminuição do tempo de corrida. Deste modo, fluxos mais altos seria a melhor escolha para o método proposto se não fosse pelo aumento no consumo da fase móvel. Nesse sentido, o fluxo mais apropriado foi o de 1,0 mL min⁻¹, pois consumiu 50% menos solvente que o maior fluxo avaliado (1,5 mL min⁻¹), sem aumentar consideravelmente o tempo de corrida.

4.1.2.4 Temperatura

A temperatura de forno utilizada em CLAE é um parâmetro importante a ser avaliado não somente pela possibilidade da diminuição do tempo de retenção dos

analitos, mas pelo fato de também influenciar na resolução e na simetria dos picos cromatográficos.

Para avaliar a influência da temperatura, quatro ensaios foram realizados, sendo observadas em cada modificação, o perfil e a resolução entre os picos cromatográficos (Figura 12). De acordo com os dados obtidos, o aumento da temperatura não diminuiu significativamente o tempo de corrida e, além disso, prejudicou a qualidade da separação cromatográfica. Portanto, a temperatura de escolha foi de 25°C, utilizada durante todo o processo de desenvolvimento do método.

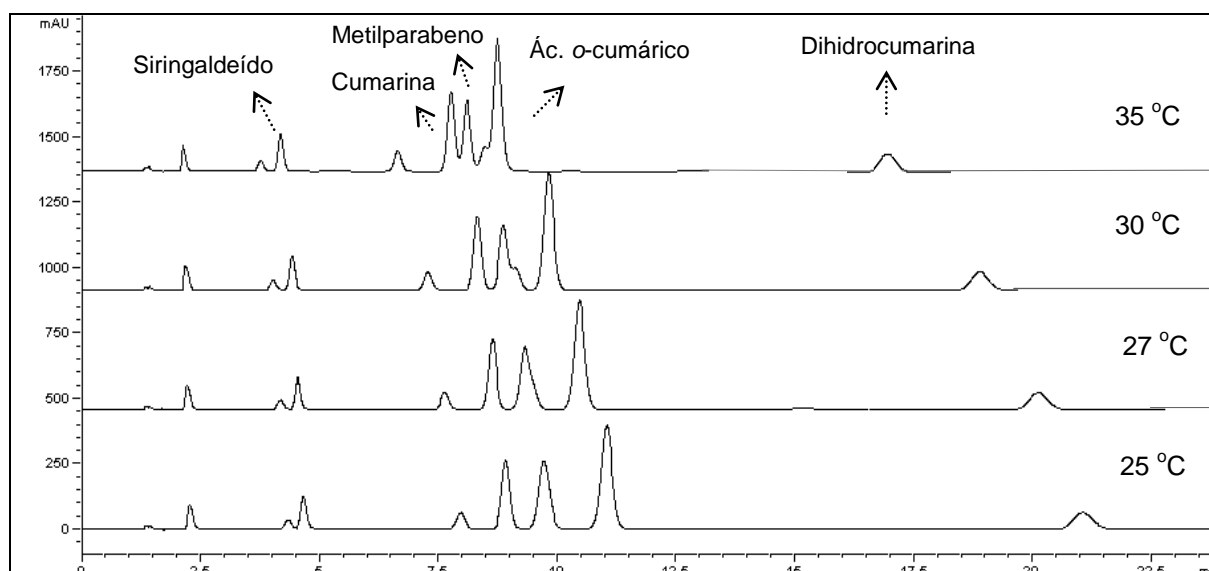


FIGURA 12 – CROMATOGRAMAS DE UMA SOLUÇÃO ORAL DE GUACO FORTIFICADA OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-DAD EM DIFERENTES TEMPERATURAS.

NOTA: Fase móvel: água/metanol/acetonitrila/ácido fórmico (65:30:5:1 v/v/v/v); eluição isocrática; fluxo: 1 mL min⁻¹; detecção: 274 nm; volume de injeção: 20 µl. Amostra utilizada: Solução oral de guaco (amostra 1) fortificada com 25 µg mL⁻¹ de cada composto (cumarina, ác. o-cumárico, dihidrocumarina e siringaldeído).

4.1.3 Avaliação do método

O desempenho do método foi determinado após injeções consecutivas de uma amostra fortificada com 25 µg mL⁻¹ de cada composto (Figura 13). Os parâmetros de adequabilidade foram avaliados seguindo os critérios da Farmacopéia

Americana 31ª edição (USP, 2008), sendo analisados o tempo de retenção (T_r), fator de retenção (K'), resolução (R_s), número de pratos teóricos (N) e o fator de cauda (T). Os resultados foram obtidos automaticamente através do software ChemStation versão A 10.02 sendo disponibilizados na Tabela 11.

TABELA 11 – PARÂMETROS AVALIADOS PARA VERIFICAÇÃO DA ADEQUABILIDADE DO MÉTODO DE CLAE-DAD.

Compostos (25 µg mL ⁻¹)	Parâmetros avaliados (Média n=6)				
	T_r (min)	K'	$R_s \pm CV\%$	T	N
Siringaldeído	4.526	3.11	1.77 ± 0,51	1.11	8287
Cumarina	8.624	6.84	3.02 ± 0,86	1.05	13453
Ácido <i>o</i> -cumárico	10.572	8.61	2.93 ± 0,52	1.05	10852
Dihidrocumarina	20.223	17.38	17.13 ± 0,71	1.04	12644

NOTA: Fase móvel: água/metanol/acetonitrila/ácido fórmico (65:30:5:1 v/v/v/v); eluição isocrática; fluxo de 1 mL min⁻¹; detecção: 274 nm; volume de injeção: 20 µL. Amostra utilizada: Solução oral de guaco (amostra 1) fortificada com 25 µg mL⁻¹ de cumarina, ác. *o*-cumárico, dihidrocumarina e siringaldeído.

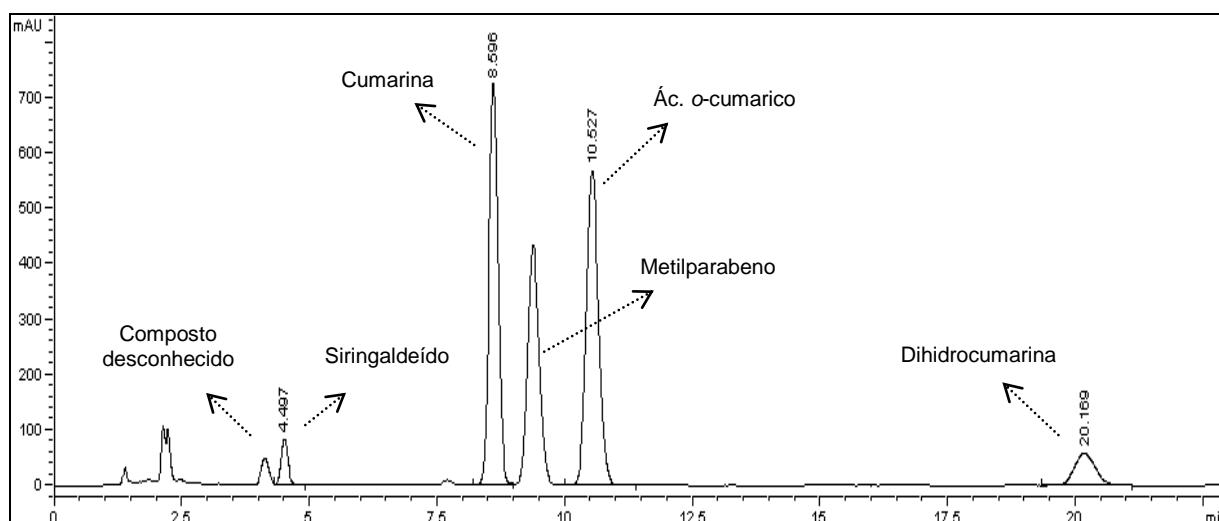


FIGURA 13 – CROMATOGRAMA DE UMA SOLUÇÃO ORAL DE GUACO FORTIFICADA UTILIZADO PARA AVALIAÇÃO DA ADEQUABILIDADE DO MÉTODO.

NOTA: Fase móvel: água/metanol/acetonitrila/ácido fórmico (65:30:5:1 v/v/v/v); eluição isocrática; fluxo de 1 mL min⁻¹; detecção: 274 nm; volume de injeção: 20 µL. Amostra utilizada: Solução oral (amostra 1) fortificada com 25 µg mL⁻¹ de cumarina, ác. *o*-cumárico, dihidrocumarina e siringaldeído.

Em virtude de as farmacopéias não discutirem valores de referência para fins comparativos destes parâmetros, grande parte dos trabalhos utilizam como referência o *Reviwer Guidance – Validation of chromatographic methods* do *Food and Drug Administration* (FDA, 1994). De acordo com este guia, os valores desejáveis para a adequabilidade do sistema cromatográfico são: número de pratos teóricos maiores que 2000; fator de capacidade $> 2,0$; Fator de cauda $\leq 2,0$; resolução $> 2,0$ com desvio padrão relativo $\leq 1,0$. No entanto, literaturas mais recentes indicam que um fator de cauda próximo de 1,0 deve ser o desejado em uma análise por cromatografia líquida. Além disso, uma resolução de pelo menos 1,5 garante separação completa entre dois compostos, sendo um fator de capacidade $>1,0$ suficiente para não haver perda de exatidão do método (SKOOG *et al.*, 1999).

Independente dos valores e da literatura utilizada como referência, o método demonstrou uma excelente eficiência da coluna com número de pratos teóricos superiores a 8300 (Tabela 11). Estes resultados garantem além de uma boa eficiência de separação, que analitos de baixa concentração poderão ser detectados com segurança, sem que ocorram problemas como alargamento de bandas e perdas na sensibilidade do método.

O resultado de fator de capacidade $> 3,1$ expressou a capacidade de afinidade dos analitos pela fase estacionária, ou seja, nos garantiu que todos os analitos foram cromatografados não sendo eluídos no volume morto da coluna.

Os resultados também foram satisfatórios para o parâmetro de resolução. De acordo com os dados obtidos ($R_s > 1,8$), pode-se afirmar que os picos cromatográficos estão bem separados, não havendo, portanto, possibilidade de interferência no momento da quantificação. A resolução entre os picos cromatográficos também pode ser avaliada visualmente através da Figura13, onde é verificada uma boa separação entre todos os compostos presentes na amostra.

O novo método também apresentou excelente simetria dos picos cromatográficos com fatores de cauda próximos de 1,0 para todos os compostos. Portanto, o método proposto foi considerado reprodutível e confiável podendo ser aplicado com segurança para determinação da cumarina, ácido o-cumárico, dihidrocumarina e siringaldeído nas formas farmacêuticas xarope e solução oral de guaco.

4.1.4 Aplicabilidade do método

Para verificar a aplicabilidade do método desenvolvido, foram injetados no cromatógrafo líquido o extrato, a tintura, e as 12 formas farmacêuticas adquiridas no comércio local de Curitiba/PR. Os cromatogramas referentes a estas amostras são reportados nas Figuras 14, 15 e 16 onde é possível verificar que em todas as amostras a separação dos picos cromatográficos de interesse manteve-se otimizada, sendo, portanto, o método válido para doseamento dos compostos cumarina, ácido o-cumárico, dihidrocumarina e siringaldeído tanto nas especialidades farmacêuticas quanto nos extratos.

Em virtude dos excelentes resultados, a próxima etapa foi a validação do método analítico. De acordo com a resolução da ANVISA, a RE nº 899 de 29 de maio de 2003, os parâmetros de validação a serem avaliados são: especificidade, linearidade, intervalo, precisão (intra-corrida e inter-corridas), robustez e exatidão.

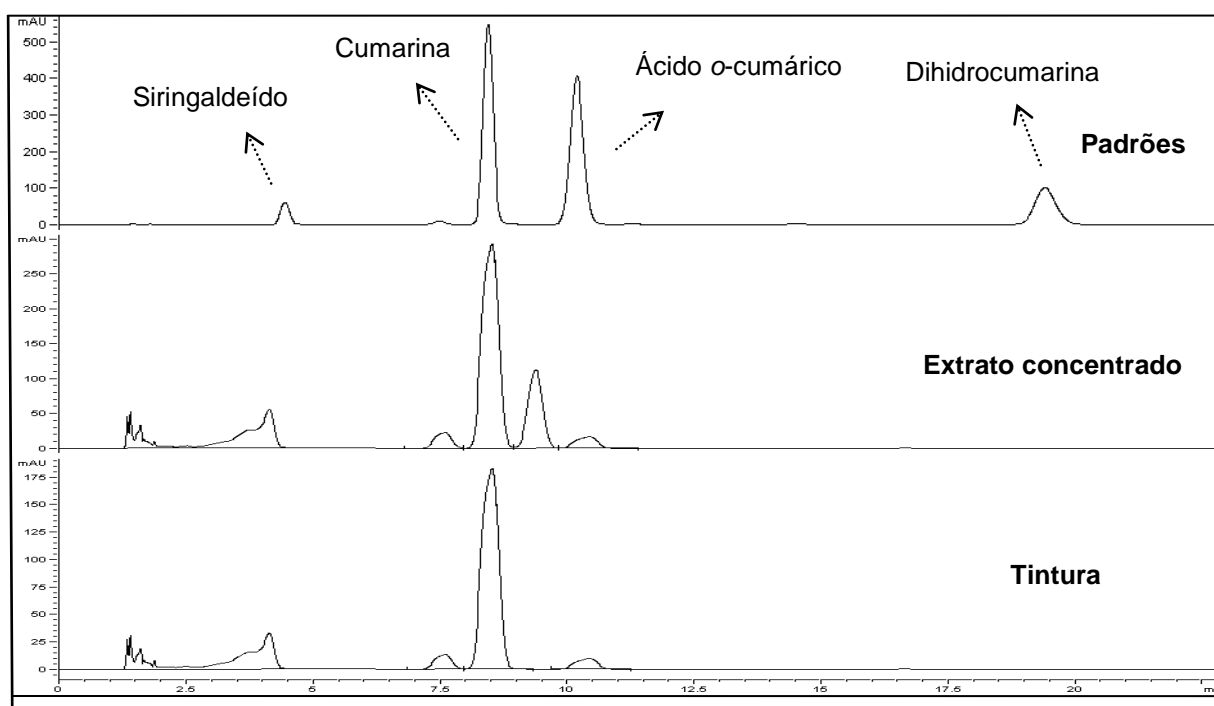


FIGURA 14 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS PADRÕES DE CUMARINA, SIRINGALDEÍDO, ÁCIDO O-CUMÁRICO, DIHIDROCUMARINA E DAS AMOSTRAS DE TINTURA E EXTRATO CONCENTRADO DE GUACO.

NOTA: Fase móvel: água/metanol/acetonitrila/ácido fórmico (65:30:5:1 v/v/v/v); eluição isocrática; fluxo de 1 mL min⁻¹; detecção: 274 nm; volume de injeção: 20 µl.

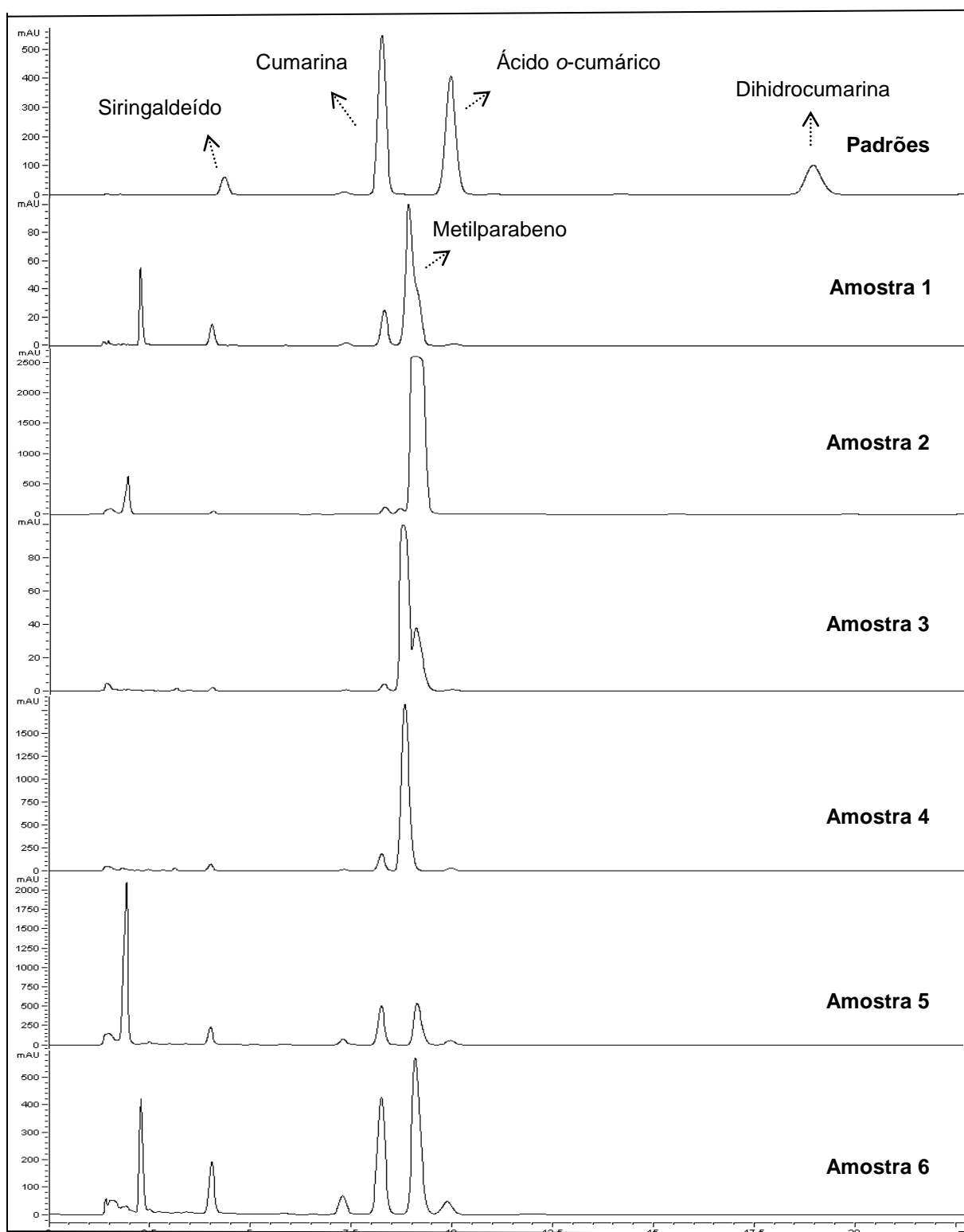


FIGURA 15 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS PADRÕES DE METABÓLITOS DO GUACO E DE AMOSTRAS DE XAROPE E SOLUÇÃO ORAL DE GUACO DE DIFERENTES MARCAS OBTIDAS NO COMÉRCIO LOCAL DE CURITIBA-PR (AMOSTRAS 1 A 6).

NOTA: Fase móvel: água/metanol/acetonitrila/ácido fórmico (65:30:5:1 v/v/v/v); eluição isocrática; fluxo de 1 mL min⁻¹; detecção: 274 nm; volume de injeção: 20 µL.

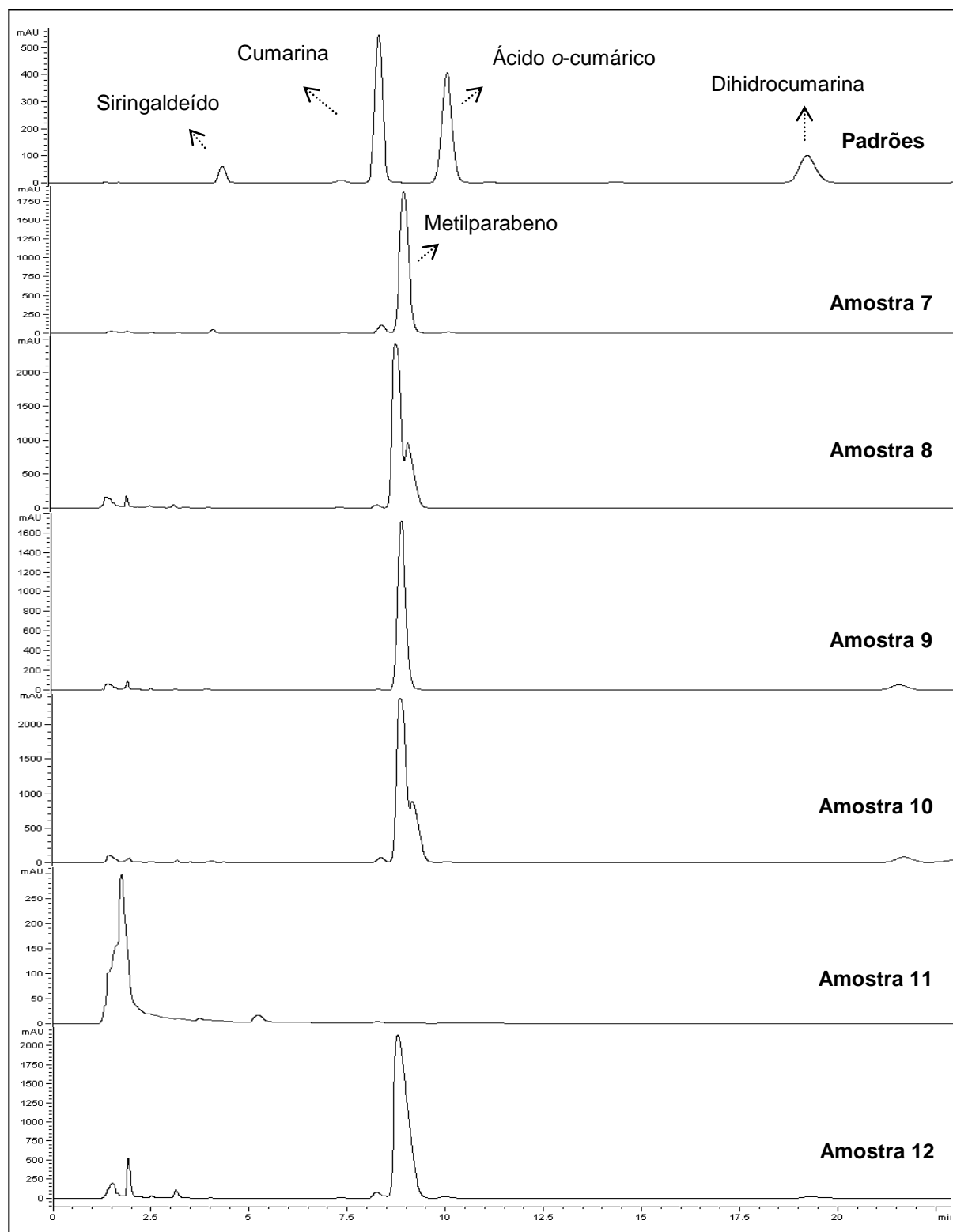


FIGURA 16 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS PADRÕES DE METABÓLITOS DO GUACO E DE AMOSTRAS DE XAROPE E SOLUÇÃO ORAL DE GUACO DE DIFERENTES MARCAS OBTIDAS NO COMÉRCIO LOCAL DE CURITIBA-PR (AMOSTRAS 7 A 12).

NOTA: Fase móvel: água/metanol/acetonitrila/ácido fórmico (65:30:5:1 v/v/v/v); eluição isocrática; fluxo de 1 mL min⁻¹; detecção: 274 nm; volume de injeção: 20 µL.

4.1.5 Validação do método de CLAE-DAD

4.1.5.1 Seletividade

Para determinar a seletividade do método, três modelos distintos de avaliação foram utilizados, sendo estes: método da comparação da matriz, método de adição do padrão e uso de detectores de arranjo de diodo. A utilização de três modelos de avaliação deste parâmetro foi devido à complexidade das matrizes, havendo, portanto, a necessidade de garantia na resposta dos analitos, conforme recomendação do ICH (ICH, 2005).

4.1.5.1.1 Método da comparação da matriz

O método da comparação da matriz consistiu em um comparativo gráfico entre duas matrizes: Uma isenta metabólitos de interesse e outra fortificada com 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada analito. O ensaio foi realizado tanto para a matriz de xarope quanto para a de solução oral.

Após as injeções no equipamento os cromatogramas das matrizes foram sobrepostos e avaliados. Conforme verificado nas Figuras 17 e 18, para o modelo utilizado o método demonstrou boa seletividade, não sendo verificado, portanto a interferência de coadjuvantes e edulcorantes comumente utilizados nestas especialidades farmacêuticas tais como os parabenos e a sacarina. Nas condições cromatográficas as quais foram realizadas esse ensaio, cabe uma ressalva quanto ao propilparabeno, ao qual em análise isolada não eluiu em menos de trinta minutos de corrida. Devido à possibilidade de um alto tempo de retenção deste e de outros compostos presentes nas amostras, após a injeção de cada triplicata das formas farmacêuticas, um método curto de limpeza foi aplicado de forma a preservar a coluna (item 4.3.4).

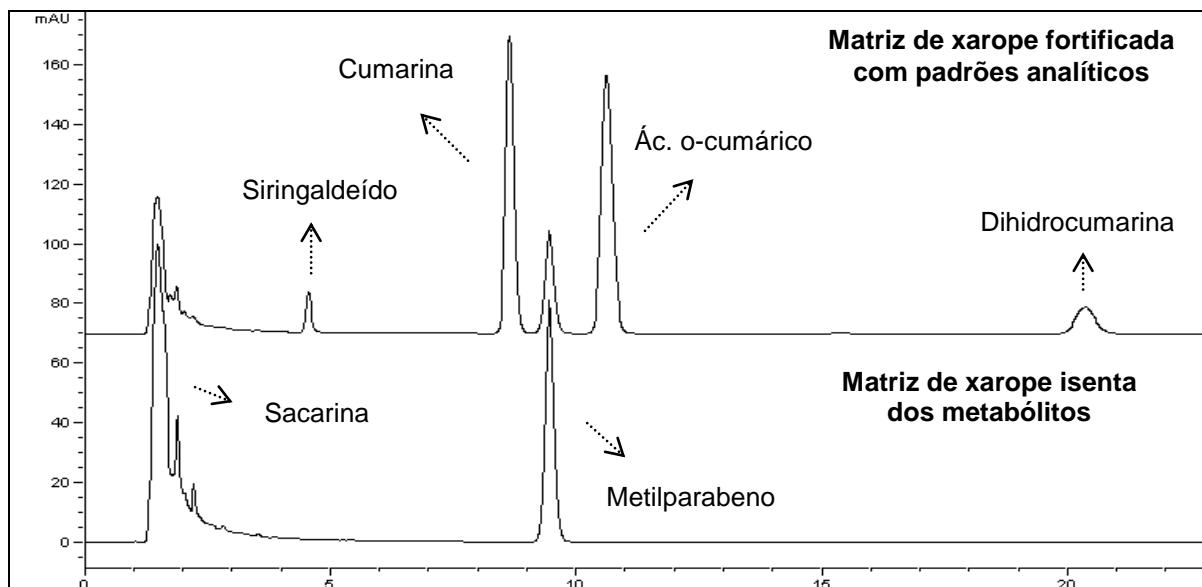


FIGURA 17 – ESPECTRO DE CLAE-DAD DA MATRIZ DE XAROPE ISENTA DOS METABÓLITOS E DA MATRIZ FORTIFICADA COM PADRÕES ANALÍTICOS.

NOTA: Fase móvel: água/metanol/acetonitrila/ácido fórmico (65:30:5:1 v/v/v/v); eluição isocrática; fluxo de 1 mL min⁻¹; detecção: 274 nm; volume de injeção: 20 µL.

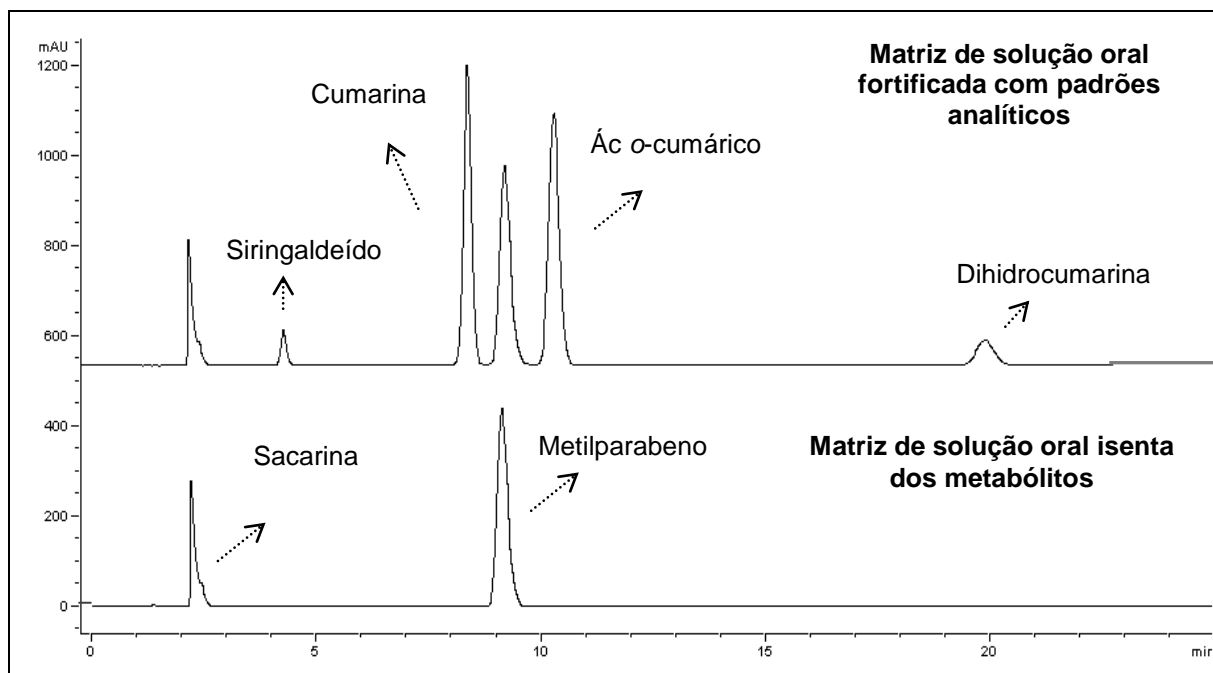


FIGURA 18 – ESPECTRO DE CLAE-DAD DA MATRIZ DE SOLUÇÃO ORAL ISENTA DOS METABÓLITOS E DA MATRIZ FORTIFICADA COM PADRÕES ANALÍTICOS.

NOTA: Fase móvel: água/metanol/acetonitrila/ácido fórmico (65:30:5:1 v/v/v/v); eluição isocrática; fluxo de 1 mL min⁻¹; detecção: 274 nm; volume de injeção: 20 µL. Matriz fortificada com 25 µg mL⁻¹ de cumarina, ácido o-cumárico, dihidrocurmarina e siringaldeído.

4.1.5.1.2 Método de adição do padrão

O método de adição do padrão consistiu na comparação dos coeficientes angulares obtidos entre duas curvas analíticas, sendo uma através de soluções padrão, e outra através de uma amostra fortificada com padrões analíticos.

No modelo proposto, soluções padrão contendo uma mistura de cumarina, ácido *o*-cumárico, siringaldeído e dihidrocumarina foram preparadas em três níveis de concentração, aos quais 2,5; 25 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada composto.

Em seguida, amostras de xarope e de solução oral de guaco foram diluídas 1:10 v/v e fortificadas nos mesmos níveis de concentração da solução padrão.

As amostras fortificadas e as soluções padrão foram preparadas em triplicata sendo as áreas obtidas de cada composto em cada nível de concentração apresentadas nas Tabelas 12 e 13.

TABELA 12 - ÁREAS OBTIDAS DE CADA ANALITO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES PARA SOLUÇÕES DA AMOSTRA DE SOLUÇÃO ORAL FORTIFICADA COM OS METABÓLITOS DO GUACO E PARA AS SOLUÇÕES DE PADRÕES.

Analitos em estudo	Níveis de concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	Soluções padrão			Amostra de solução oral fortificada		
	2,5	25	100	2,5	25	100
	Média das áreas (n=3)					
Cumarina	200,775	2101,149	8338,131	2351,53	4235,01	10503,03
Ácido <i>o</i>-cumárico	241,135	2402,208	9477,233	410,43	2584,46	9667,03
Siringaldeído	16,518	184,344	731,182	17,521	178,392	727,931
Dihidrocumarina	38,089	400,697	1597,696	36,019	397,081	1602,032

TABELA 13 - ÁREAS OBTIDAS DE CADA ANALITO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES PARA SOLUÇÕES DA AMOSTRA DE XAROPE FORTIFICADA COM OS METABÓLITOS DO GUACO E PARA AS SOLUÇÕES DE PADRÕES.

Analitos em estudo	Níveis de concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	Soluções padrão			Amostra de xarope fortificada		
	2,5	25	100	2,5	25	100
	Média das áreas (n=3)					
Cumarina	200,775	2101,149	8338,131	392,070	2147,26	8442,48
Ácido o-cumárico	241,134	2402,208	9477,233	267,160	2362,560	9697,833
Siringaldeído	16,518	184,344	731,182	15,484	172,718	736,347
Dihidrocumarina	38,089	400,697	1597,696	36,334	398,725	1528,486

De posse destas áreas, as curvas analíticas foram traçadas individualmente para cada composto através da análise de regressão linear, onde foram obtidas as equações das retas. Os coeficientes angulares foram por fim comparados. Os gráficos da análise de regressão linear dos padrões e das amostras fortificadas são demonstrados nas Figuras 19 e 20 enquanto que o comparativo entre os resultados dos coeficientes angulares obtidos através das equações das retas na Tabela 14.

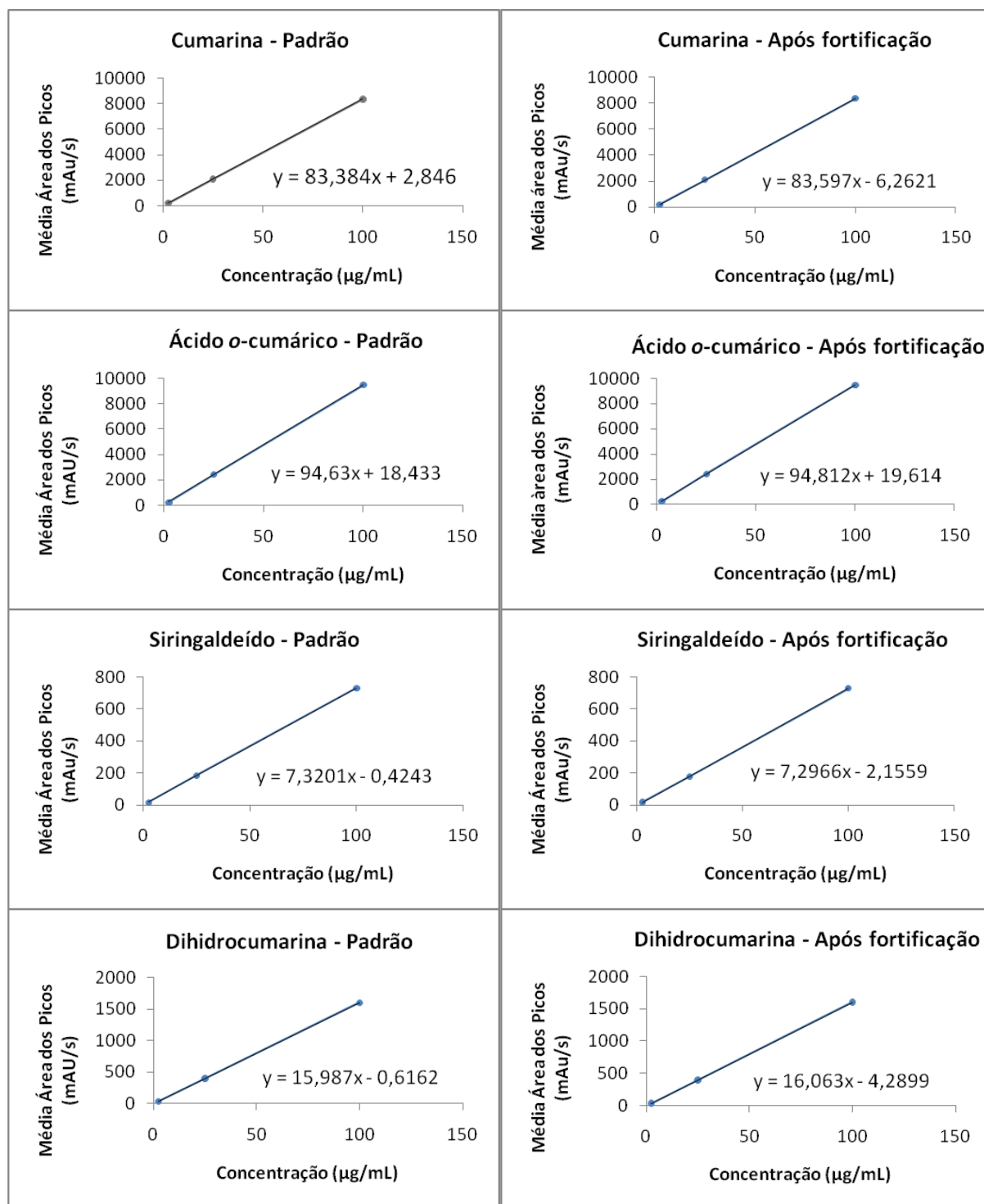


FIGURA 19 – CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS ATRAVÉS DE CLAE-DAD PARA O ENSAIO DE SELETIVIDADE DA SOLUÇÃO ORAL DE GUACO.

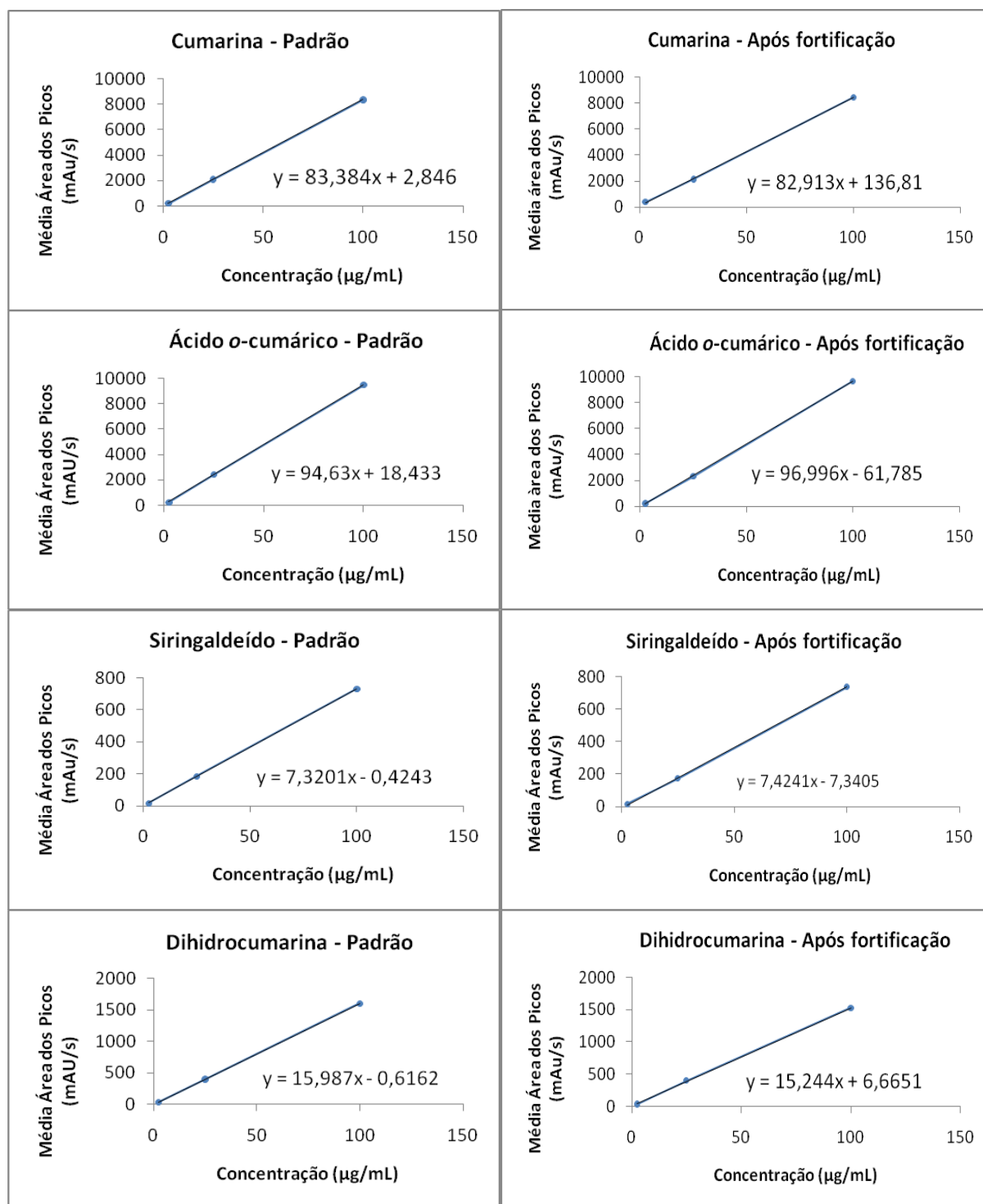


FIGURA 20 – CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS ATRAVÉS DE CLAE-DAD PARA O ENSAIO DE SELETIVIDADE DO XAROPE DE GUACO.

TABELA 14 – COEFICIENTES ANGULARES OBTIDOS A PARTIR DE CURVAS ANALÍTICAS DE SOLUÇÕES PADRÃO E DAS AMOSTRAS DE XAROPE E DE SOLUÇÃO ORAL DE GUACO FORTIFICADAS PARA AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE.

	Coeficientes angulares			
	Cumarina	Ac o-cumárico	Siringaldeído	Dihidrocumarina
Solução padrão	83,384	94,629	7,320	15,987
Solução Oral	83,597	94,812	7,297	16,063
Média	83,491	94,721	7,308	16,025
DP	0,1504	0,1291	0,0167	0,0536
CV%	0,18	0,14	0,23	0,33
Xarope	82,913	96,996	7,424	15,544
Média	83,149	95,813	7,372	15,765
DP	0,3336	1,6736	0,0735	0,3135
CV%	0,40	1,75	0,99	1,99

De acordo com os resultados obtidos, para ambas as matrizes os coeficientes angulares foram próximos daqueles obtidos através das soluções padrão ($CV < 5\%$). Portanto, não houve interferência de outros compostos na resposta dos analitos, sendo o método desenvolvido considerado seletivo.

4.1.5.1.3 Avaliação da seletividade através de detector de arranjo de diodo

Outra forma de avaliar a seletividade do método foi através do uso de detector de arranjo de diodo. Nesse método padrões analíticos de cumarina, ácido o-cumárico, dihidrocumarina e siringaldeído foram injetados no CLAE juntamente com amostras de xarope e de solução oral fortificadas com os mesmos compostos. As bandas de absorção no ultravioleta dos padrões foram sobrepostas às bandas de absorção de seus correspondentes nas amostras fortificadas. O ensaio demonstrou que não houve diferenças entre as bandas para nenhum dos compostos estudado (Figura 21 e 22). Dessa forma, pode-se dizer que os picos cromatográficos estão puros, sendo, portanto, o método seletivo para ambas as formas farmacêuticas.

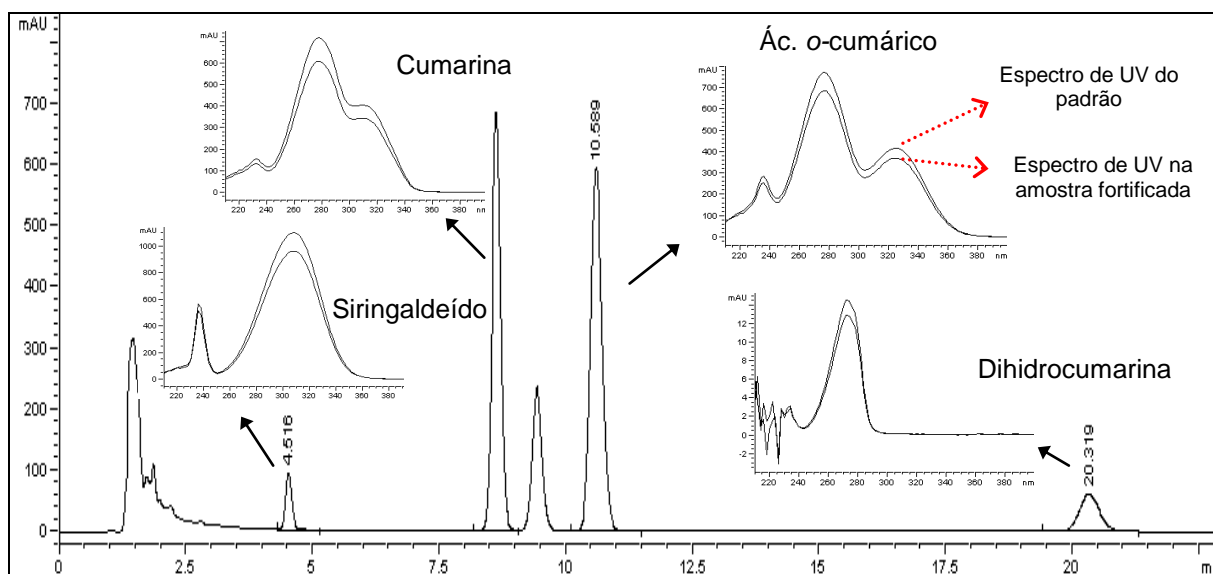


FIGURA 21 – ESPECTROS DE ULTRAVIOLETA E CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE XAROPE DE GUACO FORTIFICADA OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-DAD PARA AVALIAÇÃO DA PUREZA CROMATOGRÁFICA DOS PICOS.

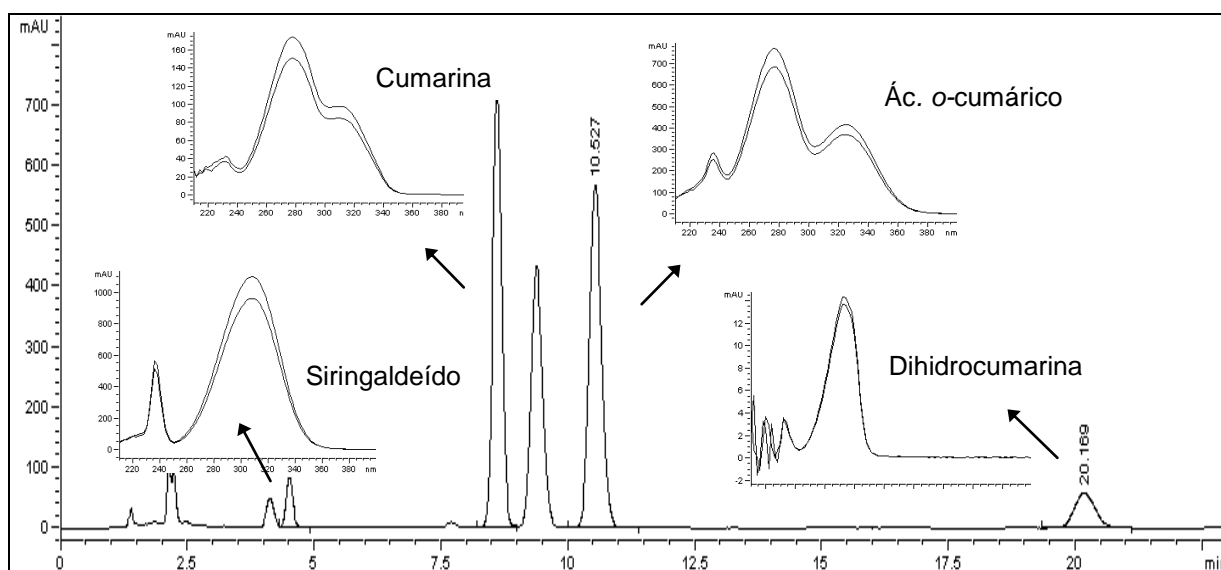


FIGURA 22 – ESPECTROS DE ULTRAVIOLETA E CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE SOLUÇÃO ORAL DE GUACO FORTIFICADA OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-DAD PARA AVALIAÇÃO DA PUREZA CROMATOGRÁFICA DOS PICOS.

4.1.5.2 Limite de detecção e limite de quantificação

LD e LQ foram estimados a partir da relação sinal/ruído e para tanto, soluções de $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada composto foram diluídas de forma seriada em concentrações decrescentes até $0,020 \mu\text{g mL}^{-1}$. As séries de diluições foram injetadas no cromatógrafo líquido até a obtenção do menor pico detectável.

A estimativa do limite de detecção foi baseada na relação de pelo menos três vezes a altura do ruído da linha base enquanto que o limite de quantificação, de pelo menos 10 vezes. Além disso, a estimativa do limite de quantificação obedeceu aos critérios de precisão e exatidão estabelecidos para o método.

De acordo com a Tabela 15, Baseado na relação sinal / ruído, o limite de quantificação dos metabólitos em estudo, variaram entre $0,156$ a $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Entretanto, uma coerência linear das áreas do ácido o-cumárico e do siringaldeído só foi possível de ser verificada em concentrações próximas de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Portanto esta concentração foi utilizada para compor o ponto mais baixo das curvas de calibração de todos os compostos.

TABELA 15 - LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS PADRÕES DE CUMARINA, ÁCIDO O-CUMÁRICO, SIRINGALDEÍDO E DIHIDROCUMARINA.

	Parâmetro de validação	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Altura do sinal em 274 nm (mAU)
Cumarina	LD	0,01953	0,087
	LQ	0,15652	0,580
Ácido o-cumárico	LD	0,03906	0,084
	LQ	0,15652	0,520
Siringaldeído	LD	0,15625	0,099
	LQ	0,62500	0,380
Dihidrocumarina	LD	0,31250	0,130
	LQ	1,00000	0,360

DADOS: Sinal / ruído da fase móvel: 0,030 mAU.

NOTA: LD – Limite de detecção e LQ – Limite de quantificação.

4.1.5.3 Linearidade e intervalo

4.1.5.3.1 Linearidade

Após o estudo do limite de detecção e do limite de quantificação foi possível determinar a linearidade do método. Neste ensaio, as curvas de calibração foram obtidas através de uma diluição seriada de uma triplicata de solução de trabalho contendo uma mistura de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cumarina, ácido o-cumárico, siringaldeído e dihidrocumarina. A linearidade foi determinada em oito níveis de concentração, em um total de 24 pontos dentro de uma faixa de concentração de 1 a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ para todos os compostos. As amostras foram injetadas no cromatógrafo líquido, sendo a média das áreas de cada composto nos diferentes níveis de concentração, apresentados na Tabela 16.

TABELA 16 - ÁREAS DOS PICOS DOS PADRÕES DOS METABÓLITOS EM ESTUDO OBTIDAS ATRAVÉS DE CLAE-DAD PARA A CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO.

Compostos	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$							
	1	2,5	5,0	10	25	50	100	200
	Média das áreas							
Cumarina	71,99	185,34	379,09	746,05	1910,63	3678,08	7412, 5	15451,
DP	1,79	2,96	2,12	9,23	10,18	12,72	65,88	136,47
CV%	2,49	1,60	0,56	1,24	0,53	0,35	0,89	0,88
Ác. o-cumárico	88,97	221,34	445,38	871,00	2246,53	4397,77	8863,32	18689,3
DP	1,09	1,08	0,50	1,64	0,66	70,78	251,01	69,44
CV%	1,22	0,49	0,11	0,19	0,03	1,61	2,83	0,37
Siringaldeído	6,82	17,31	34,47	67,53	173,43	348,24	685,60	1448,19
DP	0,08	0,01	0,13	0,35	0,38	3,74	26,26	3,41
CV%	1,20	0,60	0,38	0,51	0,22	1,07	3,83	0,24
Dihidrocumarina	18,24	43,49	87,81	171,30	390,79	781,15	1595,99	3181,75
DP	0,11	0,27	0,33	3,95	4,71	5,62	25,65	45,02
CV%	0,62	0,61	0,37	1,78	1,20	0,72	1,61	1,41

De posse dos resultados da Tabela 16, as áreas de cada analito foram submetidas à análise de regressão linear (Figuras 23, 24, 25 e 26) onde foram obtidas a equação da reta e os coeficientes de correlação (R). Além disso, o coeficiente de variação (CV%) foi aplicado a fim de avaliar a dispersão dos dados em cada nível de concentração, enquanto que para o controle da relação entre as variáveis foram aplicados os limites de confiança e de predição. Para calcular as incertezas ao longo da curva de calibração, a análise de variância de resíduos foi aplicada em cada curva obtida. Este teste também foi utilizado para verificar a aceitabilidade do modelo linear utilizado, bem como para validar a regressão. O teste de variância de resíduos e os limites de confiança e de predição foram realizados no nível de confiança de 95% (QUEENIE; CHUI; ZUCCHINI, 2000; SANTOS *et. al.*, 2003).

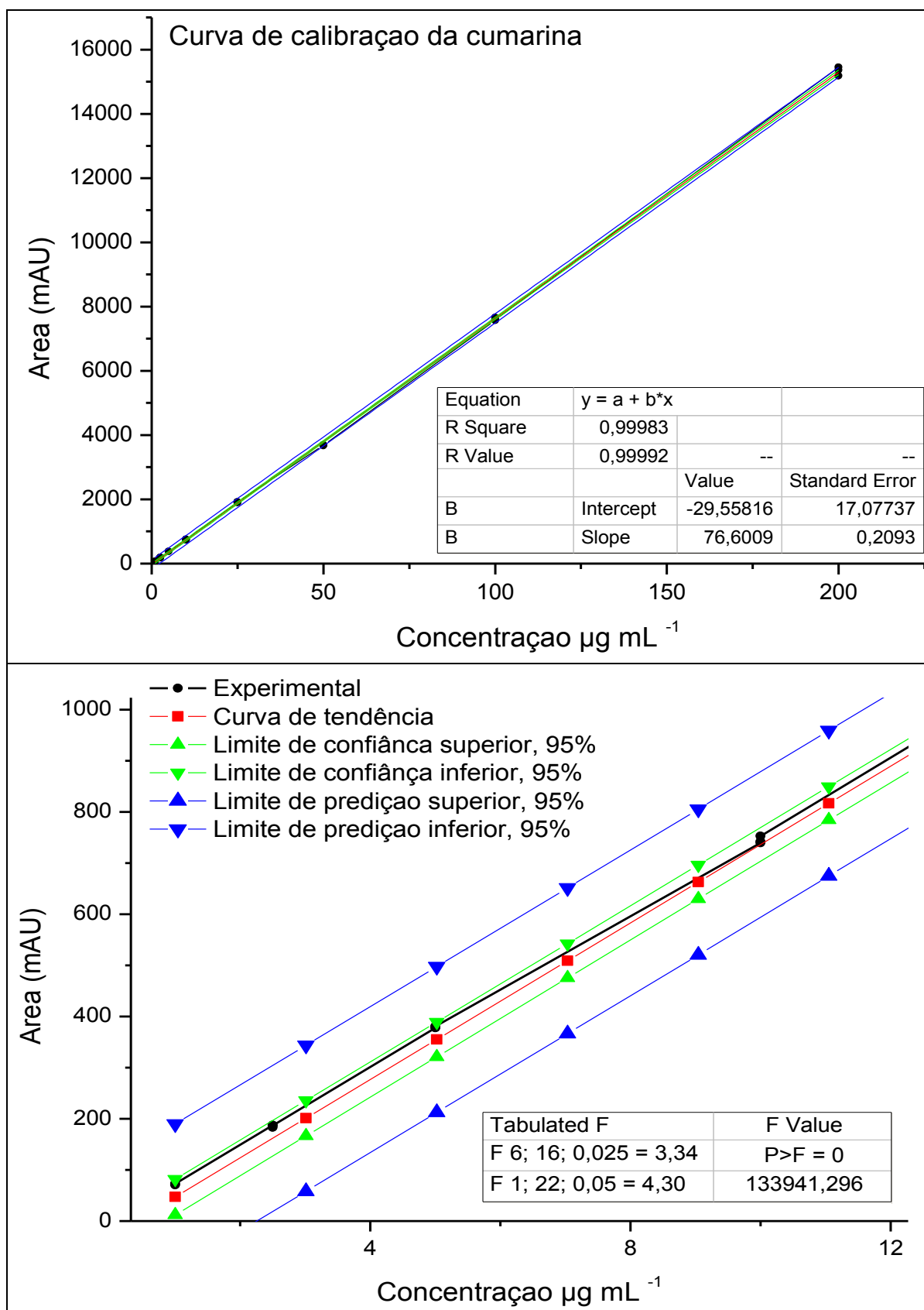


FIGURA 23 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CUMARINA OBTIDA ATRAVÉS DE CLAE-DAD.

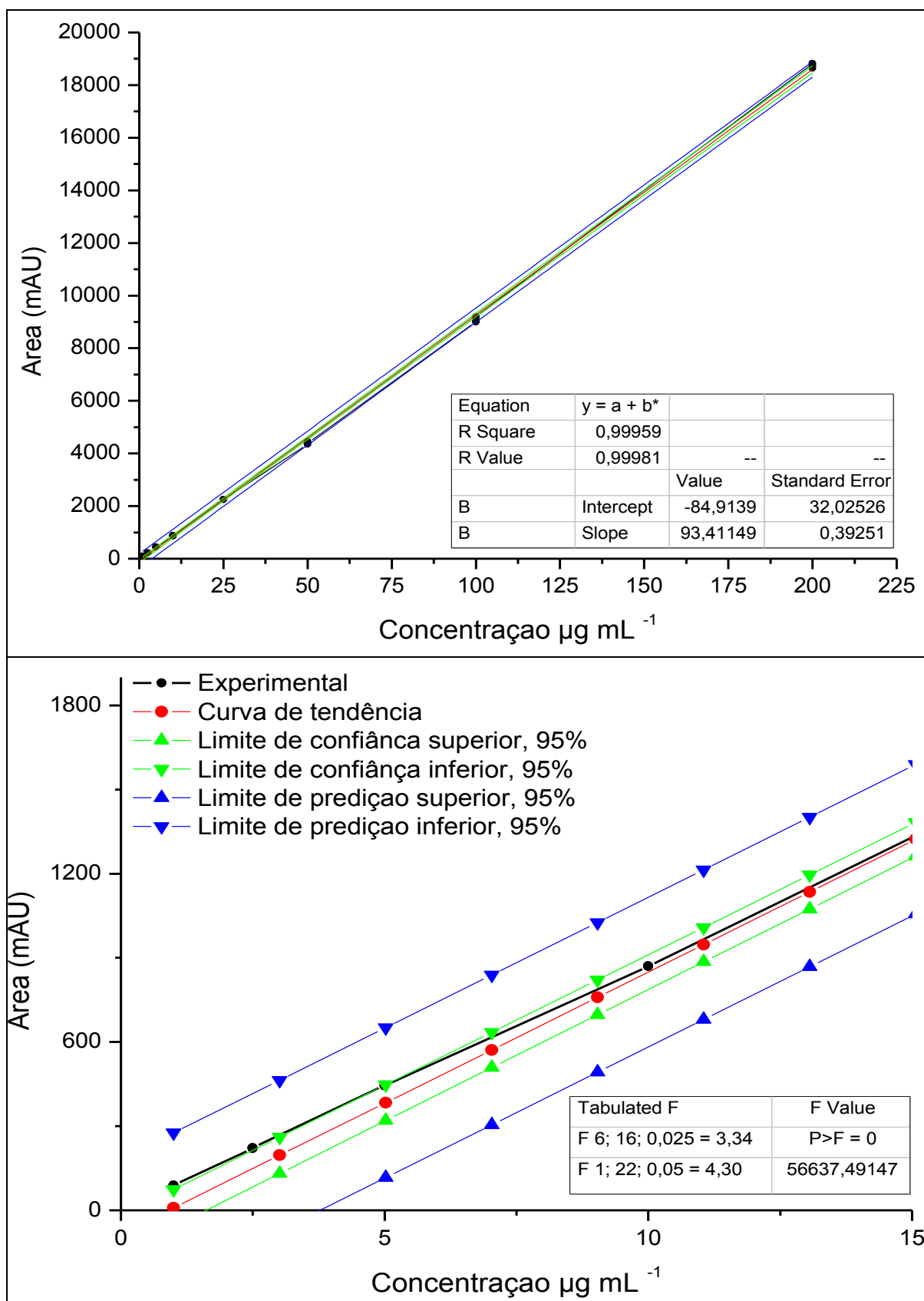


FIGURA 24 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO O-CUMÁRICO OBTIDA ATRAVÉS DE CLAE-DAD.

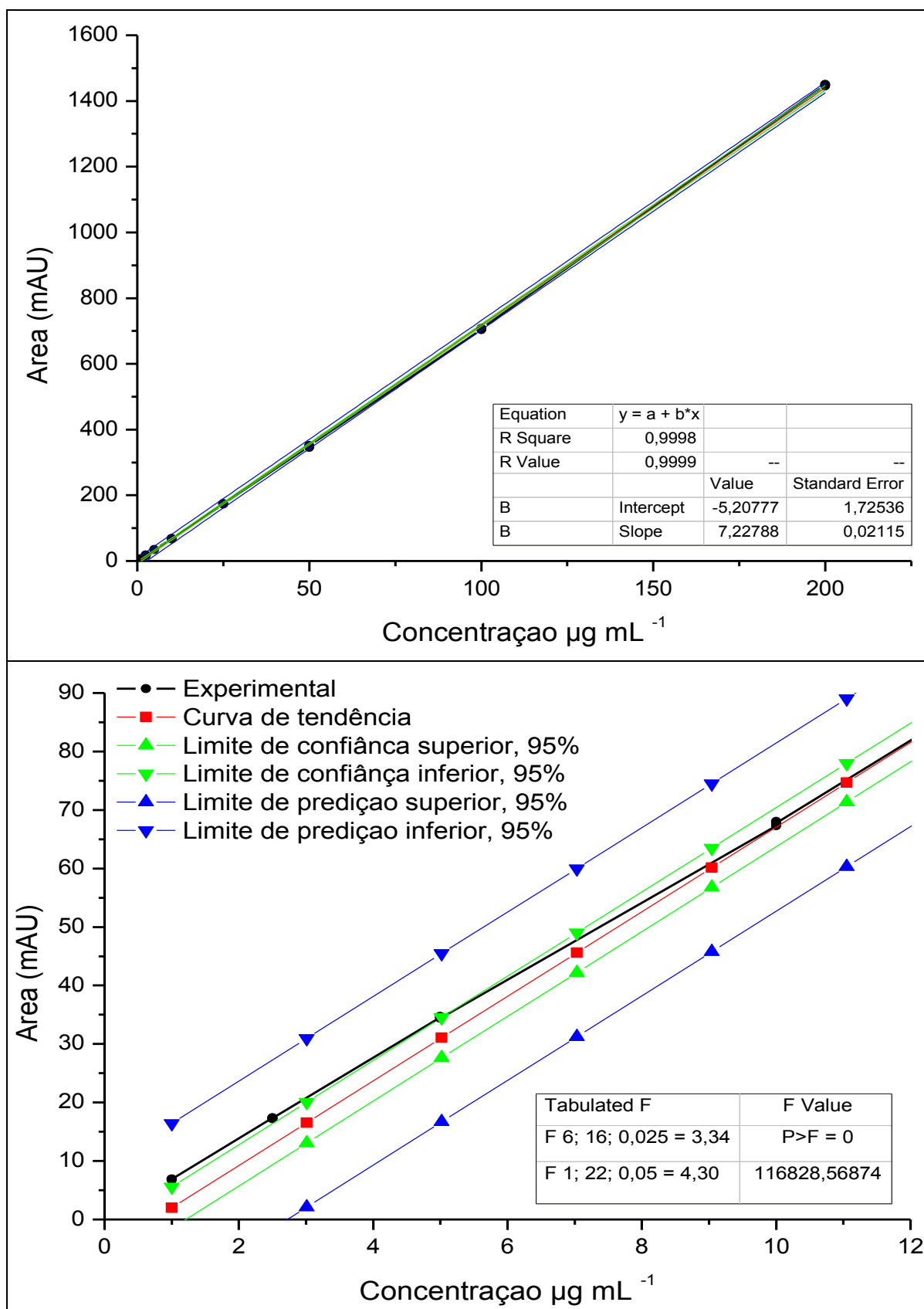


FIGURA 25 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO SIRINGALDEÍDO OBTIDA ATRAVÉS DE CLAE-DAD.

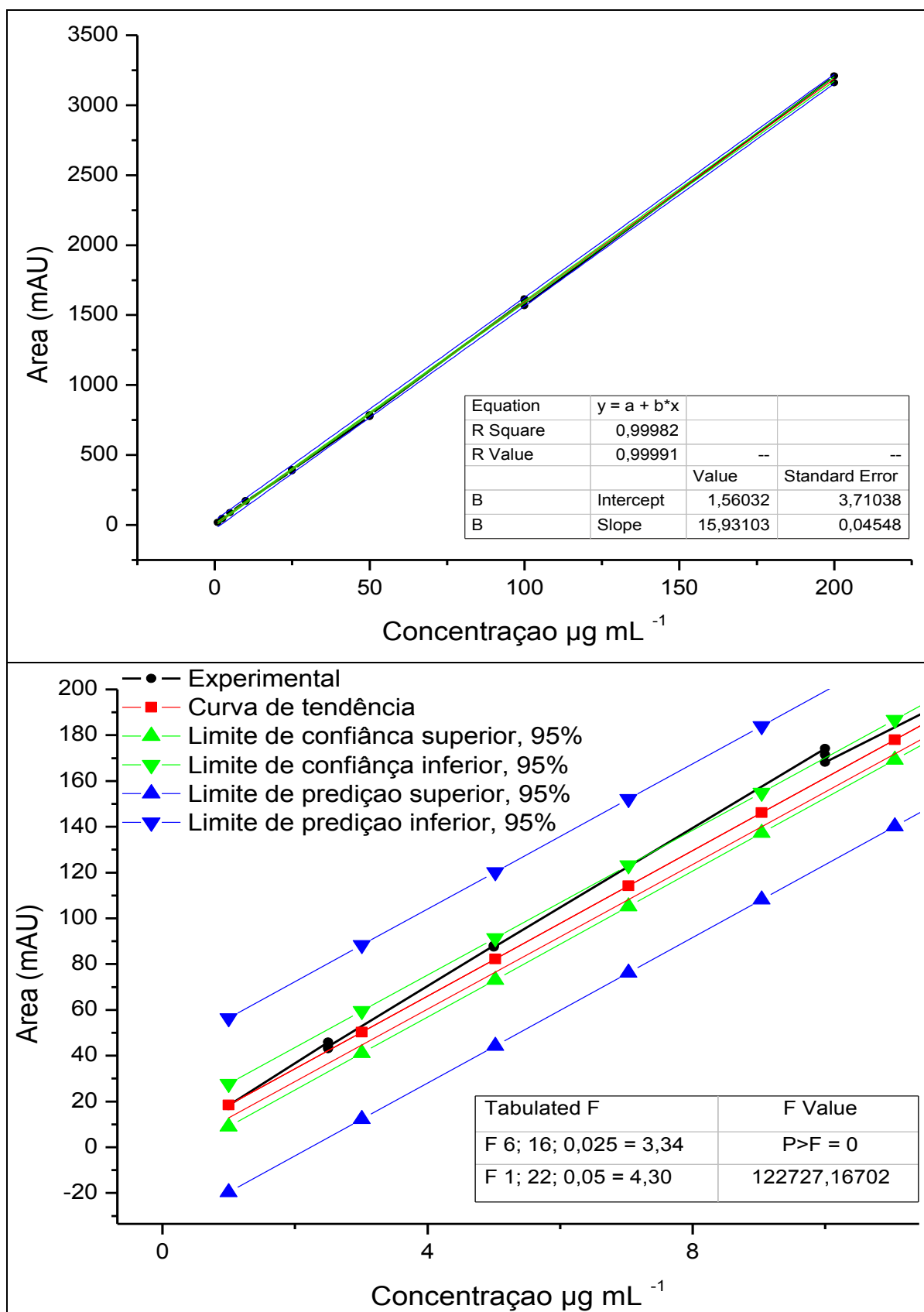


FIGURA 26 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DIHIDROCUMARINA OBTIDA ATRAVÉS DE CLAE-DAD.

De acordo com os resultados apresentados, para os quatro compostos em estudo a linearidade foi aceita através do teste de ajuste do modelo linear com valores nulos (zero) de probabilidade de $F \geq F$ crítico tabelado. Esses dados comprovam que as variações entre as áreas obtidas em um mesmo nível da curva (eixo y) são independentes dos níveis de concentração (eixo x) garantindo, portanto, que o modelo linear utilizado é adequado para análise destes compostos.

As regressões foram consideradas significativas quando da aplicação do teste de validade de regressão com valores de F de 133941 para cumarina, 56637 para o ácido o-cumárico, 116829 para o siringaldeído e 122727 para a dihidrocumarina, ou seja, o F determinado foi significativamente maior que o F crítico (4,30). Dessa forma infere-se que a inclinação da reta de regressão não ocorre ao acaso e que as variações das áreas são de fato, correlacionadas às variações de concentração.

As curvas de calibração foram consideradas controladas através dos gráficos de controle de regressão (nível de 95%). Embora alguns dos pontos estudados se encontrem fora dos limites de confiança, a linha experimental foi traçada em torno destes eixos e, além disso, em nenhuma das curvas estes pontos extrapolaram os limites superiores e inferiores de predição. Estes resultados além de garantirem a exatidão das curvas excluem qualquer possibilidade de erros sistemáticos ou não aleatórios passíveis de ocorrência em alguns dos níveis de concentração estudados.

A precisão entre as replicatas também foi comprovada nos oito níveis de concentração analisados aos quais não apresentaram variações maiores que 5% de CV, conforme apresentado na Tabela 22. O método também demonstrou grande eficiência da regressão com valores de $R > 0,9996$ para teste de eficiência de regressão (*R Square*) e $R > 0,9998$ no cálculo de eficiência máxima.

Em virtude dos resultados obtidos, dentro de uma faixa de concentração de 1 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ o método foi linear e pode ser utilizado com segurança na determinação da cumarina, ácido o-cumárico, dihidrocumarina e siringaldeído nas formas farmacêuticas xarope e solução oral a base de guaco.

4.1.5.3.2 Intervalo de trabalho

O intervalo de trabalho compreende a faixa entre o limite de quantificação superior e inferior de um método analítico, sendo derivado do estudo de linearidade. É estabelecido pela confirmação de que na concentração em estudo, o método apresenta precisão, exatidão e linearidade adequadas (BRASIL, 2003a).

Para compor o limite inferior de quantificação das curvas de calibração, a concentração de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi escolhida para todos os compostos. Conforme pode ser observado na Tabela 16 do ensaio de linearidade, nesta concentração os analitos responderam com segurança aos critérios de precisão, com um coeficiente de variação significativamente menor que aqueles obtidos na concentração mais baixa do estudo ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Além disso, embora a concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ tenha demonstrado boa linearidade, com uma dispersão maior dos resultados poderia haver comprometimento da exatidão do método, principalmente para os analitos aos quais possuem uma menor sensibilidade no comprimento de onda de escolha, caso da dihidrocoumarina e do siringaldeído.

Para compor o limite superior de quantificação das curvas de calibração a escolha foi baseada na concentração máxima esperada dos analitos em estudo. Em virtude de algumas formas farmacêuticas declararem na bula somente a quantidade de extrato adicionado na amostra, os teores dos analitos foram superestimados em $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo esta, portanto, a concentração de escolha para compor o limite superior de quantificação das curvas de calibração. Importante mencionar que nesta concentração as variações obtidas entre as réplicas foram menores que 3,8%, cumprindo, portanto com os critérios de precisão (Tabela 16).

Conforme mencionado no ensaio de linearidade, dentro do intervalo de trabalho escolhido ($2,5$ a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) o método demonstrou exatidão adequada para todos os compostos. Estes resultados sugerem intervalo de concentração otimizado para determinação dos metabólitos secundários do guaco em estudo.

4.1.6 Precisão

4.1.6.1 Repetibilidade

Para a determinação deste parâmetro, soluções padrões de cumarina, ácido o-cumárico, siringaldeído e dihidrocumarina foram preparadas em triplicata nas concentrações de 2,5; 25; e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras foram injetadas em um intervalo de tempo curto sendo as áreas de cada analito, em cada nível de concentração comparadas entre os dois períodos.

Conforme reportado na Tabela 17, para os quatro analitos em estudo, foi observado um CV < 5% entre os dois períodos de análise. Dessa forma, o método foi considerado preciso para o ensaio de repetibilidade.

TABELA 17 – ÁREAS DOS PICOS DOS METABÓLITOS EM ESTUDO OBTIDAS ATRAVÉS DE CLAE-DAD PARA DETERMINAÇÃO DA REPETIBILIDADE.

Analitos	Concent. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Período 1 Áreas* \pm DP	Período 2 Áreas* \pm DP	Média \pm DP	CV (%)
Cumarina	2,5	200,78 \pm 9,26	201,81 \pm 1,71	201,29 \pm 0,73	0,36
	25	2101,15 \pm 29,69	2079,07 \pm 6,63	2090,11 \pm 15,61	0,75
	100,0	8341,05 \pm 75,80	8299,18 \pm 204,01	8320,12 \pm 29,60	0,36
Dihidro cumarina	2,5	44,16 \pm 1,37	43,29 \pm 1,40	43,73 \pm 0,617	1,41
	25	377,42 \pm 2,61	395,78 \pm 4,52	386,60 \pm 12,99	3,36
	100,0	1522,07 \pm 9,92	1618,61 \pm 31,53	1570,34 \pm 68,26	4,35
Ácido o-cumárico	2,5	241,14 \pm 5,39	236,79 \pm 2,18	238,96 \pm 3,07	1,28
	25	2402,21 \pm 29,69	2450,84 \pm 8,01	2426,53 \pm 34,39	1,42
	100,0	9480,61 \pm 73,60	9771,10 \pm 227,19	9625,85 \pm 205,40	2,13
Siringaldeído	2,5	16,52 \pm 0,35	17,66 \pm 0,50	17,09 \pm 0,81	4,73
	25	184,34 \pm 0,54	188,13 \pm 0,67	186,24 \pm 2,68	1,44
	100,0	731,54 \pm 7,33	755,72 \pm 18,81	743,63 \pm 17,10	2,30

NOTA: n=3

4.1.6.2 Precisão Intermediária

A determinação deste parâmetro de validação seguiu os mesmos critérios utilizados no ensaio de repetibilidade. No entanto, o preparo e as injeções das amostras foram realizados após dois dias do ensaio da repetibilidade, através de um segundo analista.

A Tabela 18 demonstra que na comparação dos resultados obtidos entre os diferentes analistas, o método encontra-se dentro dos limites aceitáveis de precisão, não havendo dessa forma, para nenhum dos compostos em nenhuma das concentrações, variações maiores que 5%. Em virtude dos resultados obtidos nos ensaios de repetibilidade e na precisão intermediária, pode-se inferir que o método proposto é preciso.

TABELA 18 – ÁREAS DOS PICOS DOS METABÓLITOS EM ESTUDO OBTIDAS ATRAVÉS DE CLAE-DAD PARA DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.

Analitos	Concent. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Analista 1 Áreas* \pm DP	Analista 2 Áreas* \pm DP	Média \pm DP	CV (%)
Cumarina	2,5	200,78 \pm 9,26	190,93 \pm 2,95	195,86 \pm 6,97	3,56
	25	2101,15 \pm 29,69	1971,54 \pm 17,47	2036,35 \pm 91,65	4,50
	100,0	8341,05 \pm 75,80	7772,58 \pm 323,69	8330,59 \pm 14,80	0,18
Dihidro cumarina	2,5	44,16 \pm 1,37	41,79 \pm 1,22	42,98 \pm 1,68	3,90
	25	377,42 \pm 2,61	377,47 \pm 11,89	375,26 \pm 3,06	0,82
	100,0	1522,07 \pm 9,92	1543,17 \pm 19,05	1523,56 \pm 2,10	0,14
Ácido o-cumárico	2,5	241,14 \pm 5,39	229,92 \pm 4,52	235,53 \pm 7,93	3,37
	25	2402,21 \pm 29,69	2370,43 \pm 35,96	2386,32 \pm 22,47	0,94
	100,0	9480,61 \pm 73,60	9432,88 \pm 159,46	9456,75 \pm 33,75	0,36
Siringaldeído	2,5	16,52 \pm 0,35	17,32 \pm 0,18	16,92 \pm 0,57	3,34
	25	184,34 \pm 0,54	181,76 \pm 0,55	183,05 \pm 1,82	1,00
	100,0	731,54 \pm 7,33	727,72 \pm 18,12	729,63 \pm 2,70	0,37

NOTA: n=3

4.1.7 Exatidão

Para fins de avaliação do parâmetro de exatidão, o método utilizado foi o da adição do padrão. Neste tipo de ensaio, é calculada a percentagem do erro relativo entre a concentração teórica e a concentração experimental dos analitos

Para a obtenção da concentração teórica, soluções de trabalho de concentração de 2,5; 25 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada composto foram injetadas no cromatógrafo líquido em triplicata. As áreas correspondentes de cada analito, em cada nível de concentração foram submetidas à análise de regressão linear, gerando uma reta composta por nove pontos, ao qual foi utilizada para determinação da concentração experimental.

Para obter a concentração experimental, inicialmente, foi necessário conhecer o teor dos analitos presentes na matriz de trabalho. Para tanto, uma amostra de escolha foi diluída em triplicata (1:10 v/v) e injetada no cromatógrafo líquido, sendo os metabólitos em estudo quantificados. Os resultados obtidos são apresentados na tabela a seguir:

TABELA 19 – CONCENTRAÇÃO DOS METABÓLITOS PRESENTES EM UMA MATRIZ DE SOLUÇÃO ORAL DE GUACÓ PARA O ENSAIO DE EXATIDÃO EM CLAE-DAD.

Composto	Concentração dos metabólitos presentes na matriz ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Média	DP	CV%
Cumarina	12,8531	12,8936	12,9057	12,8841	0,0275	0,21
Ácido o-cumárico	0,7940	0,7751	0,7919	0,7870	0,0104	1,32
Siringaldeído	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-
Dihidrocumarina	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-

Em seguida, esta solução oral foi fortificada com padrões analíticos nos mesmos níveis de concentração do ensaio teórico. As injeções foram realizadas em

triplicata e as áreas registradas. Os teores encontrados na amostra sem fortificação foram subtraídos dos valores obtidos com a amostra fortificada, obtendo-se, dessa forma, o teor recuperado de cada analito (concentração experimental).

A Tabela 20 demonstra os valores de concentração teórica e experimental obtidas de cada composto nos diferentes níveis de concentração avaliados. Os resultados de exatidão foram expressos em porcentagem de recuperação.

TABELA 20 – DADOS DA RECUPERAÇÃO DOS METABÓLITOS EM ESTUDO PARA ENSAIO DE EXATIDÃO EM CLAE-DAD UTILIZANDO O MÉTODO DA ADIÇÃO DO PADRÃO.

Analitos	Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Teor médio recuperado ($\mu\text{g mL}^{-1} \pm \text{DP}$)	CV%	Intervalo de confiança* ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)
Cumarina	2,5047	2,5227 \pm 0,0656	2,60	2,342 – 2,668	100,71665
	25,047	25,0402 \pm 0,3832	1,53	24,095 - 25,999	99,97289
	100,188	98,4377 \pm 0,9806	1,00	97,752 - 102,624	98,25302
Ácido o-cumárico	2,488	2,5242 \pm 0,0322	1,28	2,408 - 2,568	101,4525
	24,8805	25,3256 \pm 0,2720	1,07	24,205 - 25,556	101,7888
	99,522	99,7347 \pm 0,4663	0,47	98,364 - 100,680	100,21371
Siringaldeído	2,4849	2,4669 \pm 0,0505	2,05	2,360 - 2,610	99,27402
	24,849	24,9787 \pm 0,3374	1,35	24,012 - 25,687	100,52185
	99,396	99,6198 \pm 1,0356	1,04	96,823 - 101,969	100,22515
Dihidrocumarina	2,4948	2,4415 \pm 0,1007	4,13	2,245 - 2,745	97,86182
	24,948	24,9132 \pm 0,4461	1,79	23,840 - 26,056	99,86040
	99,792	99,9168 \pm 0,4619	0,46	98,644 - 100,940	100,12505

NOTA: *Intervalo de confiança no nível de 95%

De acordo com os resultados obtidos, para todos os analitos o erro foi maior nas menores concentrações (CV% 1,28 – 4,13). No entanto, esse fato não comprometeu a exatidão do método uma vez que todos os resultados de recuperação foram inclusos dentro de um intervalo de confiança estimado no nível de 95% de confiança.

Para o método de exatidão aplicado, a média de recuperação foi de 99,65% para cumarina, 101,15% para o ácido o-cumárico, 100,01% para siringaldeído e 99,28% para a dihidrocumarina. Estes resultados foram satisfatórios dentro dos critérios de erros máximos de 2% para exatidão. Além disso, os resultados inclusos dentro do intervalo de confiança garantiram a credibilidade do método, afirmando com 95% chance que os valores encontrados estão contidos dentro de um intervalo mínimo e máximo de estimativas prováveis. Portanto, o método pode ser considerado exato.

4.1.8 Robustez

O estudo da robustez avalia a capacidade de um método analítico em permanecer inalterado frente a pequenas e deliberadas variações.

Para métodos de cromatografia líquida, a ANVISA e o ICH recomendam que alguns fatores sejam modificados tais como o pH, lotes ou fabricantes de colunas, temperatura, fluxo e composição da fase móvel (BRASIL, 2003a; ICH, 2005). Seguindo essas recomendações, no presente estudo as variáveis mais importantes analisadas foram fluxo ($\pm 0,02 \text{ mL min}^{-1}$), temperatura ($\pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$), proporção de metanol na fase móvel ($\pm 1\%$), proporção de acetonitrila ($\pm 0,1 \%$), proporção de ácido fórmico ($\pm 0,1 \%$) e diferentes fabricantes e lotes de colunas.

De acordo com Ribani *et. al* (2004), um método só pode ser considerado robusto, se após as modificações propostas, os limites de precisão, exatidão e seletividade estiverem dentro dos critérios de aceitação. Nesse sentido, a resolução entre os picos cromatográficos foi utilizada na avaliação da seletividade enquanto

que o ensaio de recuperação, na avaliação da precisão e da exatidão do método. Além destes ensaios, como forma de avaliar o desempenho do método o fator de cauda também foi considerado, pois seus valores influenciam diretamente na exatidão, na reprodutibilidade e na sensibilidade de detecção.

Para a realização deste estudo, soluções padrão de trabalho contendo 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cumarina, ácido *o*-cumárico, dihidrocumarina e siringaldeído foram injetadas em sextuplicata nas condições otimizadas e nas condições modificadas do método. Os valores encontrados foram comparados através de análises estatísticas como CV%, intervalo de confiança, teste *t* de student e ANOVA (one way). Os resultados do ensaio de robustez encontram-se dispostos nas Tabelas 21, 22, 23, 24, 25 e 26.

TABELA 21 – FATORES DE CAUDA DETERMINADOS A PARTIR DOS CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE METABÓLITOS EM ESTUDO VARIANDO FASE MÓVEL, TEMPERATURA E FLUXO (n=6).

Parâmetro de Robustez	Cumarina		Ácido o-cumárico		Siringaldeído		Dihidrocurmarina	
	Fator de cauda ± DP	CV%	Fator de cauda ± DP	CV%	Fator de cauda ± DP	CV%	Fator de cauda ± DP	CV%
Variação no metanol								
29%	1,0342 ± 0,0067	0,3596	1,0405 ± 0,0015	0,1437	1,1327 ± 0,0032	0,4876	1,0297 ± 0,016	0,1747
Otimizado 30%	1,0350 ± 0,0069		1,0433 ± 0,0012		1,1348 ± 0,0037		1,0302 ± 0,0020	
31%	1,0410 ± 0,0067		1,0378 ± 0,0015		1,1432 ± 0,0033		1,0268 ± 0,0013	
Variação na acetonitrila								
4,9%	1,0405 ± 0,0022	0,7166	1,0450 ± 0,0035	0,2354	1,0490 ± 0,0221	1,8749	1,0373 ± 0,0023	0,7977
Otimizado 5%	1,0500 ± 0,0027		1,0495 ± 0,0024		1,0750 ± 0,0085		1,0375 ± 0,0024	
5,1%	1,0553 ± 0,0020		1,0490 ± 0,0021		1,0885 ± 0,0262		1,0392 ± 0,0024	
Variação no ácido fórmico								
0,9 %	1,0383 ± 0,0008	0,2042	1,0427 ± 0,0030	0,4030	1,0388 ± 0,0114	1,7341	1,0330 ± 0,0020	0,4530
Otimizado 1%	1,0422 ± 0,0018		1,0378 ± 0,0049		1,0755 ± 0,0079		1,0387 ± 0,0025	
1,1%	1,0387 ± 0,0016		1,0343 ± 0,0029		1,0575 ± 0,0081		1,0423 ± 0,0008	
Variação na temperatura								
23 °C	1,0405 ± 0,2084	0,7165	1,0348 ± 0,0017	0,3303	1,1333 ± 0,0248	0,5913	1,0352 ± 0,0054	0,3284
Otimizado 25 °C	1,0500 ± 0,0027		1,0410 ± 0,0022		1,1203 ± 0,0026		1,0402 ± 0,0028	
27 °C	1,0553 ± 0,0020		1,0353 ± 0,1691		1,1243 ± 0,0165		1,0337 ± 0,0029	
Variação do fluxo								
0,98 mL min ⁻¹	1,1350 ± 0,0038	0,4504	1,0950 ± 0,0040	0,5138	1,1633 ± 0,0031	0,2517	1,1633 ± 0,0031	0,2516
Otimizado 1,0 mL min ⁻¹	1,1425 ± 0,0023		1,1042 ± 0,0038		1,1690 ± 0,0049		1,1690 ± 0,0049	
1,020 mL min ⁻¹	1,1448 ± 0,0033		1,1053 ± 0,0030		1,1675 ± 0,0048		1,1675 ± 0,0048	

TABELA 22 – RESOLUÇÕES OBTIDAS A PARTIR DOS CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE METABÓLITOS EM ESTUDO VARIANDO FASE MÓVEL, TEMPERATURA E FLUXO (n=6).

Parâmetro de Robustez	Cumarina		Ácido o-cumárico		Siringaldeído		Dihidrocumarina	
	Resolução ± DP	CV%	Resolução ± DP	CV%	Resolução ± DP	CV%	Resolução ± DP*	CV%
Variação no metanol								
29%	16,3233 ± 0,0459	1,6503	5,8017 ± 0,0172	5,4467	16,3233 ± 0,0459	1,6503	17,4017 ± 0,0293	1,5433
Otimizado 30%	16,5283 ± 0,0504		5,3750 ± 0,0276		16,5283 ± 0,0504		17,0867 ± 0,0207	
31%	16,8650 ± 0,0259		5,2283 ± 0,0279		16,8650 ± 0,0259		16,8767 ± 0,0628	
Variação na acetonitrila								
4,9%	16,7383 ± 0,0945	1,1965	5,6367 ± 0,0186	4,9557	16,7383 ± 0,0945	1,1965	17,0633 ± 0,0989	0,9313
Otimizado 5%	16,3800 ± 0,0363		5,3083 ± 0,0271		16,3800 ± 0,0363		16,7533 ± 0,3128	
5,1%	16,4150 ± 0,0464		5,1117 ± 0,0232		16,4150 ± 0,0464		16,8617 ± 0,0722	
Variação no ácido fórmico								
0,9 %	16,3500 ± 0,0237	0,3232	5,5600 ± 0,0179	2,2372	16,3500 ± 0,0237	0,3232	16,8183 ± 0,0674	0,3281
Otimizado 1%	16,4133 ± 0,0771		5,35167 ± 0,0172		16,4133 ± 0,0771		16,9167 ± 0,0455	
1,1%	16,30833 ± 0,0248		5,3483 ± 0,0184		16,3083 ± 0,0248		16,9117 ± 0,0479	
Variação na temperatura								
23 °C	13,6967 ± 0,0250	0,8278	4,6750 ± 0,0315	9,3223	13,6967 ± 0,0250	0,8278	13,9850 ± 0,0766	2,6764
Otimizado 25 °C	13,7333 ± 0,0320		4,3200 ± 0,0167		13,7333 ± 0,0320		14,1917 ± 0,0397	
27 °C	13,9100 ± 0,0316		3,8767 ± 0,0258		13,9100 ± 0,0316		14,7267 ± 0,0333	
Variação do fluxo								
0,98 mL min ⁻¹	13,4450 ± 0,0497	0,1899	4,2517 ± 0,0194	0,4662	13,4450 ± 0,0497	0,1899	13,4450 ± 0,0497	0,1899
Otimizado 1,0 mL min ⁻¹	13,4067 ± 0,0539		4,2567 ± 0,0437		13,4067 ± 0,0539		13,4067 ± 0,0539	
1,020 mL min ⁻¹	13,4550 ± 0,0539		4,2883 ± 0,0240		13,4550 ± 0,0539		13,4550 ± 0,0539	

TABELA 23 – DADOS DA RECUPERAÇÃO DA CUMARINA VARIANDO FASE MÓVEL, TEMPERATURA E FLUXO PARA ENSAIO DE ROBUSTEZ (n=6).

Cumarina							
Parâmetro de Robustez	Área dos picos (Média ± DP)	Concentração calculada (µg mL ⁻¹)	Recuperação % (média)	Intervalo de confiança % *	CV%	Valor de <i>p</i> (teste <i>t</i> de student) *	Valor de <i>p</i> (ANOVA – Fator único) *
Variação no metanol							
29%	2081,4883 ± 13,5108	25,0385	99,9662	99,26 - 100,74	0,0903	0,94335	0,890564
Nominal 30%	2082,1939 ± 13,4317	25,0470	100,000			1,00000	
31%	2085,0401 ± 13,4797	25,0812	100,1367			0,15783	
Variação na acetonitrila							
4,9%	2050,6089 ± 13,7246	25,0164	99,8777	99,22 – 100,78	0,1035	0,82052	0,865534
Nominal 5%	2053,1190 ± 13,9178	25,0470	100,000			1,00000	
5,1%	2048,9006 ± 13,1804	24,9955	99,7945			0,66711	
Variação no ácido fórmico							
0,9 %	2045,7658 ± 13,1561	25,0676	100,0821	99,28 – 100,72	0,1095	0,59452	0,814132
Nominal 1%	2044,0868 ± 12,8598	25,0470	100,000			1,00000	
1,1%	2041,3320 ± 9,7058	25,0132	99,8654			0,54927	
Variação na temperatura							
23 °C	2092,0804 ± 18,5735	25,0259	99,9157	98,76 – 101,24	0,0577	0,39473	0,911221
Nominal 25 °C	2093,8462 ± 22,6391	25,0470	100,000			1,00000	
27 °C	2094,3935 ± 14,9314	25,0535	100,0261			0,88610	
Variação do fluxo							
0,98 mL min ⁻¹	2201,7720 ± 42,1865	25,5564	102,0337	97,83 – 102,17	1,9615	0,94335	0,007693
Nominal 1,0 mL min ⁻¹	2157,8879 ± 40,7157	25,0470	100,000			1,00000	
1,020 mL min ⁻¹	2117,0969 ± 35,6843	24,5735	98,1097			8,3198 ⁻⁵	

NOTA: * Nível de confiança de 95%.

TABELA 24 – DADOS DA RECUPERAÇÃO DO ÁCIDO O-CUMÁRICO VARIANDO FASE MÓVEL, TEMPERATURA E FLUXO PARA ENSAIO DE ROBUSTEZ (n=6).

Ácido o-cumárico							
Parâmetro de Robustez	Área dos picos (Média ± DP)	Concentração calculada (µg mL ⁻¹)	Recuperação % (média)	Intervalo de confiança % *	CV%	Valor de <i>p</i> (teste <i>t</i> de student) *	Valor de <i>p</i> (ANOVA – Fator único)
Variação no metanol							
29%	2373,7615 ± 15,4902	24,8508	99,8808	99,22 – 100,78	0,1271	0,14969	0,745753
Nominal 30%	2376,5953 ± 16,1440	24,8805	100,0000			1,00000	
31%	2379,7992 ± 6,9601	24,9140	100,1348			0,44283	
Variação na acetonitrila							
4,9%	2415,6684 ± 2,8800	24,8380	99,8293	99,83 – 100,17	0,0909	0,09792	0,07341
Nominal 5%	2419,7993 ± 3,5962	24,8805	100,0000			1,00000	
5,1%	2416,4391 ± 2,7420	24,8459	99,8611			0,22869	
Variação no ácido fórmico							
0,9 %	2045,7892 ± 2,5670	24,9324	100,2086	99,64 – 100,36	0,1631	0,17360	0,054472
Nominal 1%	2041,5305 ± 6,3729	24,8805	100,0000			1,00000	
1,1%	2039,2228 ± 2,9961	24,8524	99,8870			0,46756	
Variação na temperatura							
23 °C	2483,4226 ± 4,5718	24,8476	99,8678	99,84 – 100,16	0,0841	0,10566	0,263157
Nominal 25 °C	2486,7111 ± 3,4945	24,8805	100,0000			1,00000	
27 °C	2482,8365 ± 4,5407	24,8417	99,8442			0,10580	
Variação do fluxo							
0,98 mL min ⁻¹	2604,2479 ± 41,7897	25,3483	101,8803	97,99 – 102,01	2,0014	2,3933 ⁻⁵	0,003689
Nominal 1,0 mL min ⁻¹	2556,148 ± 44,6225	24,8805	100,0000			1,00000	
1,020 mL min ⁻¹	2502,7601 ± 43,6989	24,3537	97,8829			9,5319 ⁻⁸	

NOTA: * Nível de confiança de 95%.

TABELA 25 – DADOS DA RECUPERAÇÃO DA DIHIDROCOMARINA VARIANDO FASE MÓVEL, TEMPERATURA E FLUXO PARA ENSAIO DE ROBUSTEZ (n=6).

Dihidrocomarina							
Parâmetro de Robustez	Área dos picos (Média ± DP)	Concentração calculada (µg mL ⁻¹)	Recuperação % (média)	Intervalo de confiança % *	CV%	Valor de <i>p</i> (teste <i>t</i> de student) *	Valor de <i>p</i> (ANOVA – Fator único)
Variação no metanol							
29%	366,1007 ± 9,2088	24,8659	99,6871	99,50 – 100,35	0,1794	0,51517	0,368038
Nominal 30%	357,6655 ± 9,0756	24,9480	100,0000			1,00000	
31%	351,3621 ± 8,9552	24,8764	99,7177			0,92224	
Variação na acetonitrila							
4,9%	398,7216 ± 0,5543	24,9418	99,9752	99,92 – 100,08	0,0281	0,69914	0,685864
Nominal 5%	398,8206 ± 0,2670	24,9480	100,0000			1,00000	
5,1%	398,5968 ± 0,4546	24,9340	99,9439			0,43836	
Variação no ácido fórmico							
0,9 %	397,6672 ± 0,7548	24,9991	100,2402	99,68 – 100,32	0,1075	0,21820	0,273104
Nominal 1%	396,8548 ± 1,1124	24,9480	100,0000			1,00000	
1,1%	397,0336 ± 1,2036	24,9592	100,0451			0,62551	
Variação na temperatura							
23 °C	314,3302 ± 0,6218	24,9748	100,1075	99,71 – 100,29	0,0581	0,51517	0,639741
Nominal 25 °C	313,9927 ± 0,8929	24,9480	100,0000			1,00000	
27 °C	314,0413 ± 0,5204	24,9519	100,0155			0,92224	
Variação do fluxo							
0,98 mL min ⁻¹	366,1007 ± 9,2088	25,5364	101,7322	96,58 – 102,46	2,0635	6,4554 ⁻⁵	0,056109
Nominal 1,0 mL min ⁻¹	357,6655 ± 9,0756	24,9480	100,0000			1,00000	
1,020 mL min ⁻¹	351,3621 ± 8,9552	24,5083	97,6892			1,9681 ⁻⁶	

NOTA: * Nível de confiança de 95%.

TABELA 26 – DADOS DA RECUPERAÇÃO DO SIRINGALDEÍDO VARIANDO FASE MÓVEL, TEMPERATURA E FLUXO PARA ENSAIO DE ROBUSTEZ (n=6).

Parâmetro de Robustez	Siringaldeído						
	Área dos picos (Média ± DP)	Concentração calculada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação % (média)	Intervalo de confiança % *	CV%	Valor de <i>p</i> (teste <i>t</i> de student) *	Valor de <i>p</i> (ANOVA – Fator único) *
Variação no metanol							
29%	187,8046 ± 1,7659	25,0275	100,7183			0,23632	
Nominal 30%	186,4652 ± 1,9771	24,8490	100,0000	98,78 – 101,22	0,5708	1,00000	0,11325
31%	185,6996 ± 1,0281	24,7470	99,5894			0,45351	
Variação na acetonitrila							
4,9%	190,3336 ± 1,7622	24,6631	99,2518			0,28109	
Nominal 5%	191,7684 ± 1,9975	24,8490	100,0000	98,80 – 101,20	0,3867	1,00000	0,368741
5,1%	191,3599 ± 1,4569	24,7961	99,7870			0,69509	
Variação no ácido fórmico							
0,9 %	185,1782 ± 2,0675	24,7992	99,7996			0,69026	
Nominal 1%	185,5501 ± 2,1940	24,8490	100,0000	98,64 – 101,36	0,2229	1,00000	0,790396
1,1%	186,0041 ± 1,9494	24,9098	100,2447			0,77959	
Variação na temperatura							
23 °C	191,4536 ± 2,0258	24,7930	99,7745			0,62056	
Nominal 25 °C	191,8863 ± 3,5748	24,8490	100,0000	97,86 – 102,14	0,1767	1,00000	0,919824
27 °C	192,1220 ± 2,7806	24,8795	100,1228			0,56959	
Variação do fluxo							
0,98 mL min ⁻¹	200,1895 ± 3,7146	25,4145	102,2756			8,6387 ⁻⁶	
Nominal 1,0 mL min ⁻¹	195,7353 ± 3,3658	24,8490	100,0000	98,02 – 101,98	2,2999	1,00000	0,002202
1,020 mL min ⁻¹	191,1873 ± 3,6653	24,2716	97,6765			1,5826 ⁻⁶	

NOTA: * Nível de confiança de 95%.

De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 21, para os quatro compostos em estudo, o fator de cauda não sofreu influência significativa em nenhum dos parâmetros variados ($CV < 1,9\%$). Através desses dados, foi verificado que o método proposto, mesmo com pequenas alterações manteve otimizada a simetria dos picos cromatográficos, garantindo dessa forma, segurança na reprodutibilidade do método.

No ensaio de seletividade, o ácido *o*-cumárico foi o único composto que sofreu alterações na resolução quando os parâmetros foram modificados. Conforme é demonstrado na Tabela 22, as variações que mais comprometeram a resolução do ácido *o*-cumárico foram temperatura ($CV = 9,32\%$), metanol ($CV = 5,45\%$) e acetonitrila ($CV = 4,96\%$). Estas alterações podem ser explicadas devido à proximidade deste analito (T_r 10,5 min) com a cumarina (T_r 8,3 min) ou seja, pequenas variações em um valor menor de resolução são mais significativas do que em valores maiores. Tal fato pode ser comprovado quando outros compostos com resoluções maiores foram analisados. O siringaldeído (T_r 4,5 min) e a dihidrocumarina (T_r 20,1 min) estão muito distantes dos demais compostos ($R = 16,5$ e $17,1$, respectivamente), e dessa forma apesar de terem ocorrido variações, estas foram menos sentidas. Outro fator que pode ter contribuído para o aumento na variação da resolução deste metabólito, é que ambos, cumarina e ácido *o*-cumárico podem ter comportamentos distintos de equilíbrio entre a fase estacionária e a fase móvel. Dessa forma, quando pequenas mudanças foram realizadas no método, a partição dos analitos entre a fase sólida e a líquida pode ter sido sensivelmente deslocada, e dessa forma, as mudanças no tempo de retenção foram mais perceptíveis.

Em virtude desses resultados, uma amostra de xarope fortificada com $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada composto foi injetada paralelamente ao ensaio a fim de verificar o comprometimento da resolução em uma matriz de maior complexidade. Após as injeções, foi verificado que mesmo nas condições onde a resolução teve um maior comprometimento, o perfil de separação cromatográfico permaneceu otimizado, não influenciando, dessa forma, na quantificação desses metabólitos. Portanto, o método foi considerado seletivo para o ensaio de robustez.

Em análise aos resultados de recuperação, para os quatro analitos em estudo, o coeficiente de variação foi menor que 5%, conforme apresentado nas Tabelas 23, 24, 25 e 26. Estes resultados são satisfatórios, pois denotam

repetibilidade entre os dados, sendo deste modo, o método considerado robusto quanto ao critério de precisão.

Outro parâmetro avaliado através do ensaio de recuperação foi a exatidão, ao qual demonstrou robustez para todos os analitos quando variações na temperatura, solvente orgânico e ácido fórmico foram realizadas ($p > 0,05$ para o teste t e ANOVA). Além disso, os valores de recuperação foram inseridos dentro do intervalo de confiança estimado, o que garante confiabilidade nos dados obtidos.

De uma forma geral, o único parâmetro modificado que influenciou a exatidão no ensaio de robustez foi o fluxo. Para a cumarina (Tabela 23), quando a vazão de fluxo foi diminuída, não foi verificada discrepância entre os resultados ($p = 0,9434$), ao contrário de quando a vazão foi aumentada ($p = 0,000089198$). Em virtude do resultado crítico obtido quando o fluxo foi diminuído, o parâmetro foi comprometido como um todo ($p = 0,007693$) não sendo, dessa forma, o método robusto para a cumarina frente a pequenas variações deste parâmetro.

O experimento também demonstrou que as variações no fluxo causam diferenças significativas na recuperação do ácido *o*-cumárico (Tabela 24). Com o aumento na vazão do fluxo, a recuperação deste metabólito diminuiu de tal forma que a média recuperada (97,88%) ficou abaixo do menor valor estimado para o intervalo de confiança (97,99%). Além disso, os valores de p para teste t e ANOVA (fator único) foram menores que 0,05 indicando, portanto, diferenças significativas entre os valores recuperados, e por consequência, perda da exatidão.

Os resultados de recuperação da dihidrocumarina, por sua vez, foram inclusos dentro do intervalo de confiança estimado (Tabela 25). Apesar deste bom resultado, em análise individual em cada variação de fluxo, os valores de p obtidos foram menores que 0,05 (teste t) indicando dessa forma diferenças significativas entre os valores recuperados. Para este analito, embora as variações analisadas individualmente não demonstrem exatidão, na análise de variância (ANOVA), o valor de p estatístico foi igual a 0,056, ou seja, pouco maior que o valor mínimo estabelecido. Por consequência dos resultados obtidos através do teste de t student ($p < 0,05$), e um valor de p para ANOVA muito próximo do limite de 5%, não se pode afirmar que o método seja robusto para a dihidrocumarina quando o fluxo é variado.

Dos quatro compostos estudados, o siringaldeído foi o mais sensível as mudanças de fluxo (Tabela 26). Para ambas as variações, superior e inferior, os valores de recuperação excederam os limites do intervalo de confiança estimado

(97,68% e 102,28%, respectivamente). Além disso, os valores de p foram menores que 0,05 para o teste t e ANOVA, comprometendo, portanto, a recuperação deste analito ($p= 0,000008639$ e $0,0000001583$ para teste t ; e $p= 0,002202$ para ANOVA).

De acordo com os resultados obtidos, modificações no fluxo mantêm o método preciso, mas não exato. Para as demais modificações analisadas, os resultados obtidos demonstraram exatidão e precisão. Portanto, o fluxo é um parâmetro crítico, e não deve ser modificado quando o método for aplicado.

A robustez do método também foi testada mediante diferentes lotes, marcas e fabricantes de colunas (C18 150 x 4,6 mm 5 μ m). Para tanto, uma mistura de padrões de cumarina, ácido *o*-cumárico, dihidrocumarina e siringaldeído (25 μ g mL⁻¹ cada) foi injetada no cromatógrafo líquido e a separação cromatográfica avaliada. De acordo com a Figura 27, a reprodutibilidade nos tempos de retenção dos quatro compostos foi mantida quando dois lotes distintos da coluna de escolha foram utilizados. Além disso, a separação entre os compostos permaneceu otimizada para as três marcas de colunas avaliadas, com uma ressalva quanto a coluna Spherisorb (Waters®) a qual visualmente demonstrou uma menor eficiência de separação entre a cumarina e o ácido *o*-cumárico que as demais marcas.

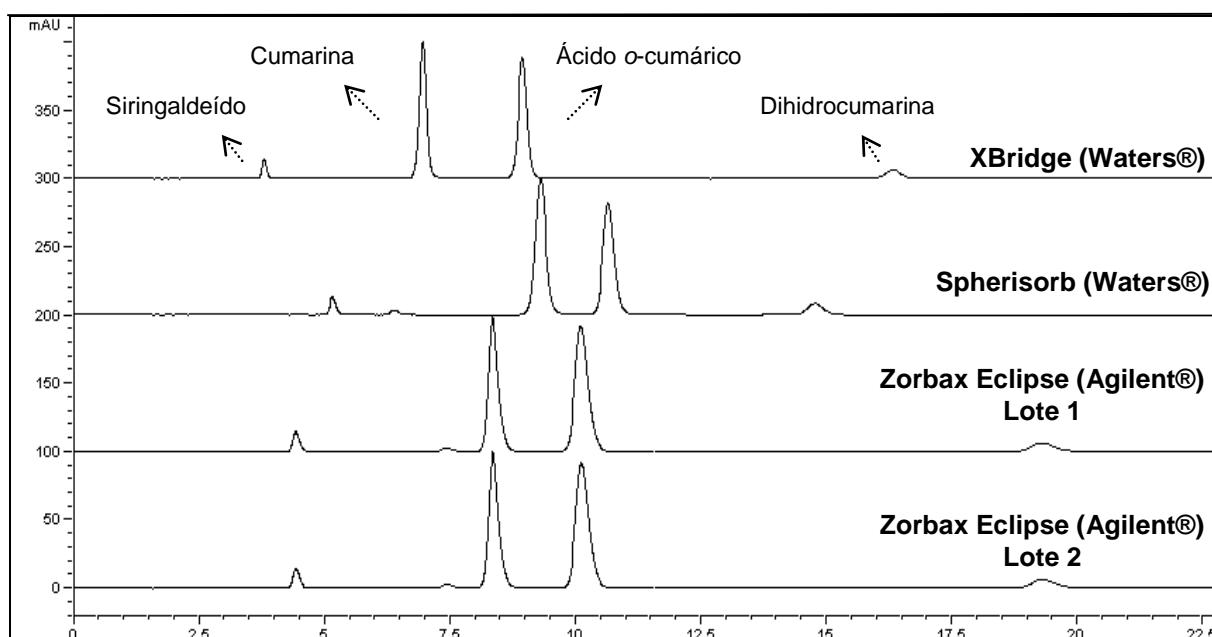


FIGURA 27 – CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE CUMARINA, ÁCIDO *O*-CUMÁRICO, DIHIDROCUMARINA E SIRINGALDEÍDO OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-DAD UTILIZANDO DIFERENTES LOTES E MARCAS DE COLUNAS.

Em virtude da excelente separação cromatográfica e da possibilidade de utilização de outras colunas para o doseamento dos metabólitos em estudo, o mesmo ensaio foi aplicado a uma solução oral de guaco fortificada com $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada composto. Os cromatogramas obtidos são apresentados na Figura 28.

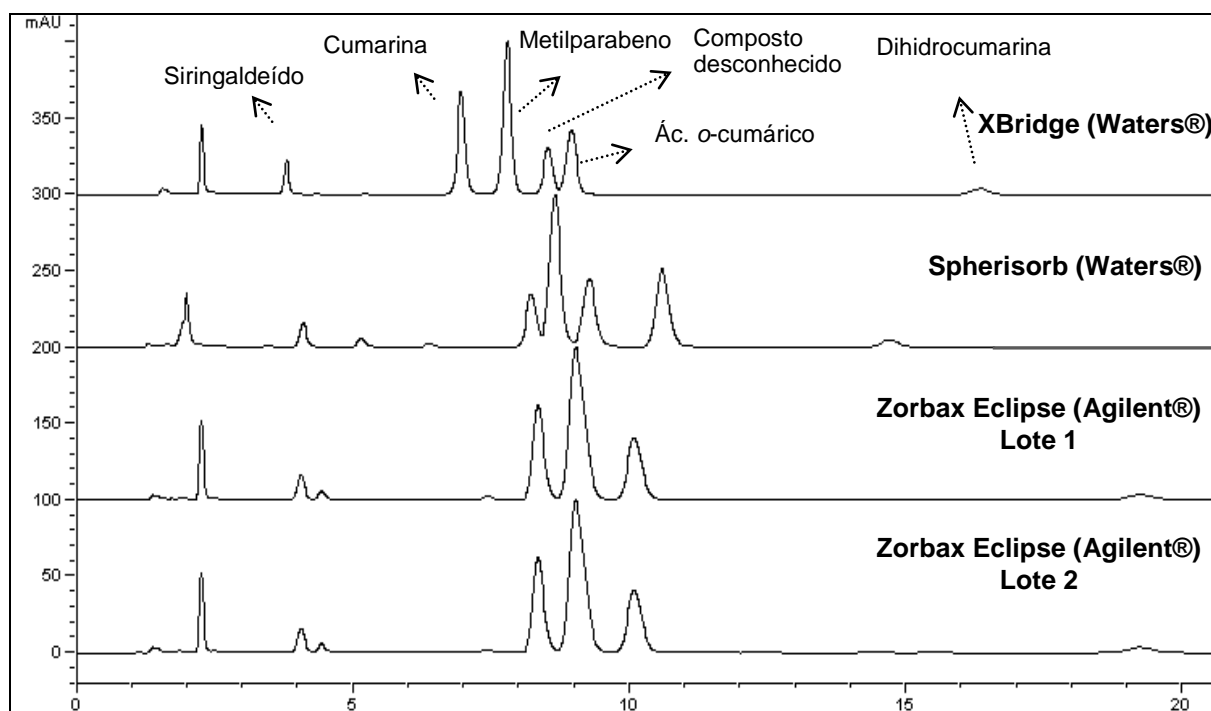


FIGURA 28 – CROMATOGRAMAS DE UMA AMOSTRA DE SOLUÇÃO ORAL FORTIFICADA COM $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ DE CUMARINA, ÁCIDO O-CUMÁRICO, DIHIDROCUMARINA E SIRINGALDEÍDO UTILIZANDO DIFERENTES LOTES E MARCAS DE COLUNAS.

Após as injeções da especialidade farmacêutica, foi observado que em uma matriz mais complexa, o doseamento de alguns dos metabólitos pode ser comprometido quando da utilização de diferentes colunas. Se por um lado a Spherisorb (Waters ®) apresentou co-eluição entre o metilparabeno, o composto desconhecido e a cumarina, a XBridge, do mesmo fabricante, resolveu melhor os picos cromatográficos. A menor eficiência de separação da coluna Spherisorb é atribuída às suas características físico-químicas, conforme observado no Quadro 9.

Propriedades	Colunas C18 (150 x 4,6 mm 5µm)		
	Spherisorb ODS2 (Waters® Corporation)	XBridge (Waters® Corporation)	Zorbax XDB (Agilent Technologies)
% carbono ligado	11,5	18	10
Tipo de partícula	Esférica	Esférica	Esférica
<i>Endcapped</i>	Simples (TMS)*	Trifuncional	Duplo
Tamanho de poro	80Å	135Å	80Å
Atividade silanol	Alta	Baixa	Baixa
Faixa de pH	2-8	1-12	2-9
Área de superfície	220	185	180
Substrato da partícula	Sílica	Híbrida	Monocamada extra densa de C18

QUADRO 9 – PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DAS COLUNAS UTILIZADAS PARA O ENSAIO DE ROBUSTEZ.

NOTA: *Trimetilsilano.

No comparativo entre as colunas, nota-se que a Spherisorb ODS2 possui área de superfície e percentagem de carbono ligado maior que a coluna de escolha (Zorbax). Apesar dessas vantagens, a eficiência de separação é menor devido ao fato da Zorbax possuir uma monocamada extra densa de C18 como substrato de partícula, fato este que não ocorre com a Spherisorb, uma coluna mais simples composta por sílica não purificada em seu substrato. Além da ineficiência de separação, a Spherisorb também demonstrou um pequeno alargamento nos picos cromatográficos, em virtude da alta atividade silanol que esta coluna possui em relação às demais, mesmo com propriedade *endcapped* declarada.

A XBridge por sua vez, possui a menor atividade silanol dentre as colunas de escolha graças à neutralização dos grupos silanois por um ligante trifuncional, propriedade essa que garante um bom perfil dos picos cromatográficos. Esta coluna também demonstrou grande eficiência de separação em virtude de uma alta percentagem de carbono ligado (18%). Portanto, esta também pode ser utilizada para quantificação dos analitos em estudo nas formas farmacêuticas xarope e solução oral de guaco, com uma ressalva quanto ao ácido o-cumárico, ao qual

maiores estudos de robustez devem ser realizados devido à proximidade entre o pico deste metabólito com outro desconhecido ($R=1,6$).

Com a aplicação de uma amostra mais complexa, a Zorbax demonstrou além de grande eficiência de separação, uma excelente reprodutibilidade nos tempos de retenção dos analitos quando dois lotes distintos desta coluna foram testados. Embora a percentagem de carbono ligado seja a menor dentre as colunas em estudo, a tecnologia de duplo *endcapped* e a camada extra densa de C18 como substrato de partícula, garantiram a essa coluna um perfil otimizado dos picos cromatográficos além de uma alta eficiência na separação dos compostos.

De acordo com as respostas obtidas neste ensaio, devido à complexidade das matrizes apenas colunas de alta eficiência de separação e com substrato de partícula diferenciado responderam de forma robusta aos critérios de seletividade. Dessa forma, para a aplicação de outras colunas, novos ensaios devem ser realizados avaliando o perfil de separação cromatográfico, o fator de cauda e a resolução entre os compostos caso a caso.

4.1.9 Determinação do teor dos metabólitos em estudos nas amostras comerciais de xarope, soluções orais, extrato e tintura de guaco

Após o desenvolvimento e a validação do método, os metabólitos cumarina, ácido *o*-cumárico, siringaldeído e dihidrocumarina foram quantificados nas formas farmacêuticas, no extrato e na tintura de guaco. Os teores médios obtidos destes metabólitos são apresentados na Tabelas 27 e 28.

TABELA 27 – TEOR DE CUMARINA, ÁCIDO O-CUMÁRICO, DIHIDROCUMARINA E SIRINGALDEÍDO OBTIDOS NA TINTURA E NO EXTRATO GUACO ATRAVÉS DE CLAE-DAD.

Amostras (n=3)	Metabólitos ($\mu\text{g mL}^{-1} \pm \text{DP}$)			
	Cumarina	Ácido o-cumárico	Dihidrocumarina	Siringaldeído
Tintura	973,62 \pm 1,28	10,20 \pm 0,04	-	-
Extrato concentrado	3924,35 \pm 1,54	43,34 \pm 1,14	-	-

NOTA: - Não detectado

TABELA 28 – TEOR DE CUMARINA, ÁCIDO O-CUMÁRICO, DIHIDROCUMARINA E SIRINGALDEÍDO OBTIDOS NAS ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS ATRAVÉS DE CLAE-DAD.

Amostras	Metabólitos ($\mu\text{g mL}^{-1} \pm \text{DP}$)			
	Cumarina	Ác. o-cumárico	Dihidrocumarina	Siringaldeído
1	280,89 \pm 1,78	16,89 \pm 0,23	-	-
2	35,97 \pm 1,62	3,45 \pm 0,11	-	-
3	28,31 \pm 0,95	7,84 \pm 0,11	-	-
4	55,35 \pm 1,79	9,56 \pm 0,03	-	-
5	169,40 \pm 0,48	23,73 \pm 0,66	-	-
6	154,61 \pm 1,17	19,64 \pm 0,44	-	-
7	33,91 \pm 0,23	5,79 \pm 0,24	-	-
8	33,04 \pm 1,71	Traços	-	-
9	2,42 \pm 0,03	Traços	-	-
10	23,21 \pm 0,19	4,79 \pm 0,22	-	-
11	2,30 \pm 0,09	Traços	-	-
12	33,42 \pm 1,09	13,92 \pm 0,05	-	-

NOTA: - Não detectado

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 27 e 28, apesar de a literatura descrever a dihidrocumarina e o siringaldeído como majoritários nos

extratos medicinais de guaco, em nenhuma das amostras estes foram detectados (LD de 0,15 e 0,31 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente).

A literatura também relata a importância do ácido o-cumárico na contribuição com as propriedades terapêuticas do guaco (SANTOS *et al.*, 2006). Apesar da grande quantidade deste metabólito encontrada nas especialidades farmacêuticas (Tabela 28), em nenhuma das amostras avaliadas o teor deste foi declarado.

O conteúdo de cumarina por sua vez foi declarado na maioria das amostras (Quadro1). Para facilitar a discussão dos resultados obtidos deste metabólito, uma tabela comparativa entre o conteúdo declarado e o teor obtido foi realizada, sendo esta apresentada a seguir:

TABELA 29 – TEOR DE CUMARINA DECLARADO E O ENCONTRADO NO DOSEAMENTO DAS ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS POR CLAE-DAD.

Análise dos resultados			
Amostras	Teor declarado de cumarina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Teor encontrado ($\mu\text{g mL}^{-1} \pm \text{DP}$)	%
1	300,00	280,89 \pm 0,55	93,63
2	35,00	35,97 \pm 0,44	102,77
3	35,00	28,31 \pm 0,06	80,89
4	80,00	55,35 \pm 0,06	69,19
5	200,00	169,40 \pm 0,48	84,70
6	200,00	154,61 \pm 1,22	77,3
7	35,00	33,91 \pm 0,23	96,89
8	Não declarado	33,04 \pm 0,24	-
9	Não declarado	2,42 \pm 0,02	-
10	Não declarado	23,21 \pm 0,19	-
11	Não declarado	2,30 \pm 0,07	-
12	Não declarado	33,42 \pm 0,107	-

NOTA: - Teor não comparado.

Através da Tabela 29, é possível visualizar a discrepância entre os teores do principal metabólito do guaco encontrados nas amostras (2,3 – 281,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Para aquelas que declaram na bula o teor de cumarina, o doseamento obtido variou de 69

a 103% do valor declarado, refletindo, portanto, na eficácia esperada destes fitoterápicos. As demais amostras, apesar de os doseamentos terem sido realizados, não puderam ser comparadas devido ao fato de declararem no rótulo apenas a quantidade de extrato adicionado ao preparado, e não a concentração de cumarina.

Para as amostras 9 e 11, em analogia aos resultados obtidos, para que o indivíduo tivesse um mínimo de efeito terapêutico através da menor dosagem diária recomendada pela ANVISA (0,5 mg), este teria que tomar mais de 200 mL de xarope ao dia, ou seja, mais de dois frascos/dia. A relevância destes baixos teores é ainda mais significativa quando comparada estas amostras com a amostra 1 (um) a qual utiliza uma dose próxima da máxima recomendada pela ANVISA de 5,0 mg de cumarina/dia. Nesse sentido, para que as amostras 9 e 11 tivessem a mesma eficácia terapêutica da amostra 1 (um) o indivíduo teria de tomar mais de 1,8 L de xarope por dia.

Adicionalmente à amostra 9, em avaliação ao perfil cromatográfico (item 5.3.5), nenhum pico, além do metilparabeno foi significativamente relevante no cromatograma. Cabe ressaltar que esta amostra apesar de ser descrita como uma associação de *M. glomerata* com outras plantas medicinais, é registrada no Ministério da Saúde. Em relação às amostras 11 e 12, a consideração a ser feita é que estas se encontram registradas no Ministério da Agricultura, e apesar disto, foram adquiridas em farmácias sendo vendidas como fitomedicamentos.

Em resumo, as discrepâncias dos conteúdos de cumarina encontradas nestes produtos sugerem falta de padronização no teor deste metabólito, bem como a necessidade de um maior controle de qualidade nestes fitoterápicos. Além disso, estudos de estabilidade devem ser realizados a fim de garantir o teor dentro dos limites especificados para os efeitos benéficos do guaco.

4.2 ANÁLISES ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM

Em virtude de alguns metabólitos do guaco não serem detectados nas formas farmacêuticas, e da possibilidade de monitorar com especificidade os cinco metabólitos em estudo, dois métodos atendendo as características de ionização de cada composto foram desenvolvidos e validados através de CLAE-EM/EM.

A CLAE-EM/EM é significativamente mais sensível que CLAE-DAD, com capacidade de detecção na ordem de ng mL^{-1} . Adicionalmente, CLAE-EM/EM possibilita a determinação de compostos mesmo que estes estejam em matrizes de alta complexidade, o que nos favorece para futuros estudos de biodisponibilidade, uma vez que foram observados teores discrepantes principalmente da cumarina nas especialidades farmacêuticas.

Dessa forma será possível saber o quanto de xarope um indivíduo deve ingerir para que os principais metabólitos do guaco sejam detectados no plasma, e assim correlacionar um mínimo de concentração plasmática para uma resposta terapêutica eficaz, propondo deste modo uma padronização em seus teores.

4.2.1 Desenvolvimento do método

4.2.1.1 Otimização dos analitos

A primeira etapa para o desenvolvimento dos métodos através de CLAE-EM/EM foi a escolha do tipo de fonte de ionização. Neste contexto a fonte de ionização Eletrospray (ESI) foi escolhida em virtude das atribuições de robustez, sensibilidade e a capacidade de trabalhar com matrizes complexas mantendo intactas as moléculas de interesse.

Em seguida foi realizada a checagem do sinal dos analitos. Neste ensaio soluções de trabalho contendo 100 ng mL^{-1} dos padrões dos metabólitos em estudo e 100 ng mL^{-1} dos padrões internos 6-metilcumarina (ESI+) e prednisona (ESI-) foram preparadas, separadamente, e infundidas no espectrômetro de massas, sendo o sinal de cada analito avaliado (Figura 29). Como representação ilustrativa, na etapa de checagem e otimização dos compostos apenas os espectros da cumarina serão apresentados.

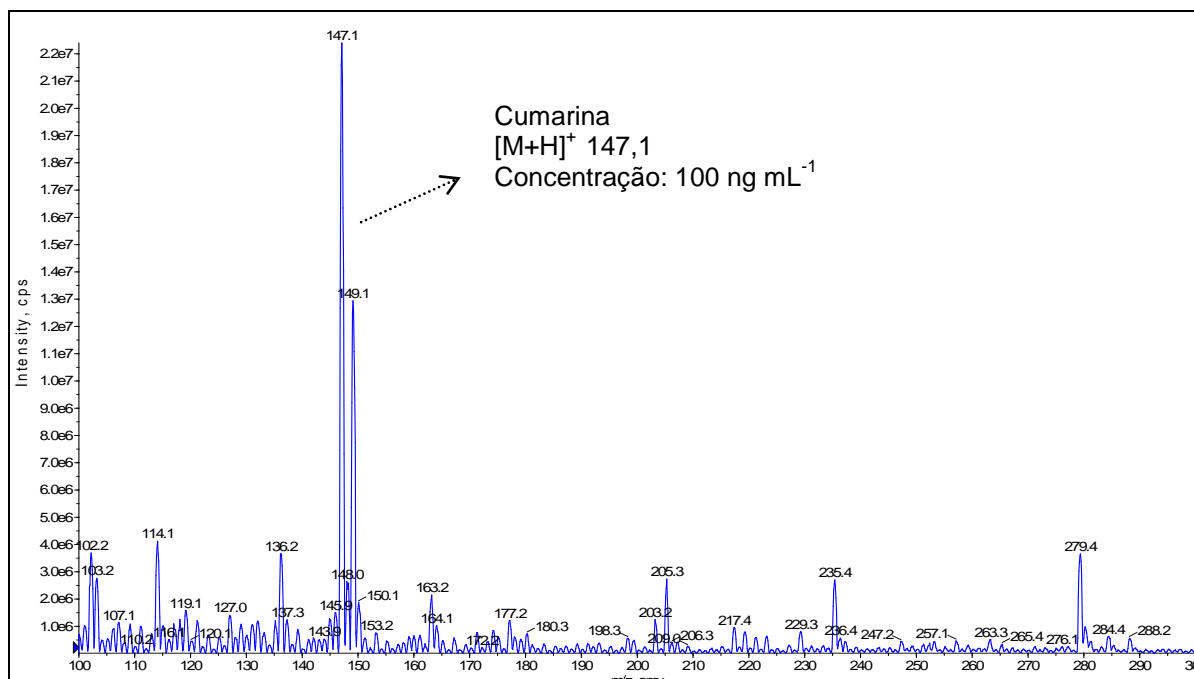


FIGURA 29 – FULL SCAN DO PADRÃO DE CUMARINA UTILIZANDO ESI NO MODO POSITIVO DE IONIZAÇÃO.

Uma vez checado o sinal do analitos, alguns ajustes de concentração foram realizados a fim de garantir uma intensidade de sinal adequada entre 2×10^5 e 1×10^6 cps. Durante essa etapa o sistema *Multiple Ions* (MI) foi utilizado como forma de avaliar a intensidade e a estabilidade do sinal de cada analito, para posterior otimização automática através de *Multiple Reaction Monitoring* (MRM).

Após a obtenção de um sinal adequado, MRM foi realizado sendo otimizados os parâmetros individuais de cada composto: *declustering potencial* (DP*), *entrance potencial* (EP), *collision cell entrance potencial* (CEP), *collision energy* (CE) e *cell exit potencial* (CXP). Ao final das otimizações foram definidos os dois fragmentos de íons mais intensos de cada analito (Figura 30 e Quadros 10 e 11), sendo o de maior intensidade utilizado para quantificação, e o segundo maior em intensidade para qualificação dos compostos. O único composto que não foi monitorado através de fragmentações foi o ácido caurenóico, ao qual após exaustivas tentativas de otimizações não produziu fragmentos de intensidade adequada, sendo dessa forma monitorado apenas o íon molecular (m/z 301.1).

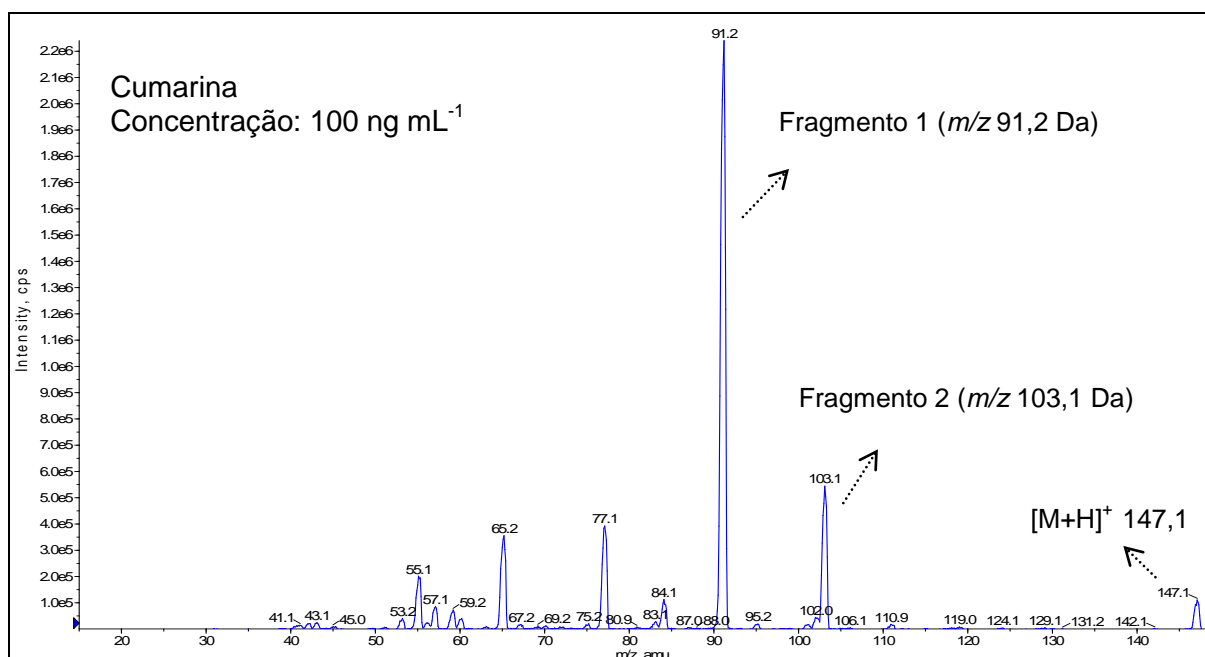


FIGURA 30 - ÍONS FRAGMENTOS DA CUMARINA (m/z 147,1 Da) OBTIDOS ATRAVÉS DE MRM NO MODO POSITIVO DE IONIZAÇÃO.

Modo de ionização positivo						
Parâmetros	Compostos [M+H] ⁺					
	Cumarina (147,3)		Dihidrocumarina (149,14)		6-metilcumarina* (161,04)	
	Fragmentos mais intensos (m/z)					
	91,0	103,10	121,10	93,10	105,20	77,10
CE	31	25	20	25	27	45
CXP	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
CEP	12		8,5		10	
DP	36		76		61	
EP	8		11		11,5	

QUADRO 10 - PARÂMETROS OTIMIZADOS ATRAVÉS DE MRM PARA OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS MAIS INTENSOS DA CUMARINA, DIHIDROCUMARINA E 6-METILCUMARINA.

NOTA: *Padrão interno

Modo de ionização negativo							
Parâmetros	Compostos [M-H] ⁻						
	Ác. o-cumárico (162,90)		Siringaldeído (180,84)		Ác. Caurenóico (301,10)	Prednisona* (357,02)	
	Fragmentos mais intensos (m/z)						
	119,0	93,1	166,0	151,0	301,1	327,0	299,0
CE	-18	-30	-20	-26	-10	-15	-15
CXP	0,0	0,0	-4	0,0	-4	-4	-4
CEP	-10		-14		-22		-18
DP	-25		-50		-70		-25
EP	-5		-3		-5		-6,5

QUADRO 11 - PARÂMETROS OTIMIZADOS ATRAVÉS DE MRM PARA OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS MAIS INTENSOS DO ÁCIDO O-CUMÁRICO, ÁCIDO CAURENÓICO, SIRINGALDEÍDO E PREDNISONA.

NOTA: *Padrão interno

Após as otimizações dos analitos, análises por injeção em fluxo (FIA) foram realizadas a fim de ajustar os parâmetros da fonte de ionização. Nesta etapa foram otimizados: *curtain gas* (CUR), *collision gas* (CAD), *nebulizer gas* (GS1), *turbo gas* (GS2), *ion spray voltage* (IS) e temperatura da fonte. Os valores otimizados destes parâmetros nos diferentes modos de ionização são descritos no Quadro 12.

Parâmetros da fonte	Modo de ionização positivo	Modo de ionização negativo
Gás de interface (CUR)	10	18
Gás de colisão (CAD)	6	6
Voltagem do capilar (IS)	5000 V	-4500 V
Gás de nebulização (GS1)	40	50
Gás secante (GS2)	40	50
Temperatura da fonte (°C)	450	550

QUADRO 12 - PARÂMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO OTIMIZADOS ATRAVÉS DE ANÁLISES POR INJEÇÃO EM FLUXO.

4.2.1.2 Análises por CLAE-EM/EM

4.2.1.2.1 Modo positivo de ionização

Para o desenvolvimento dos métodos de quantificação através de CLAE-EM/EM, foi considerado como proposta de trabalho a obtenção de métodos rápidos, simples e sem a necessidade de pré-tratamento das amostras.

Os primeiros ensaios foram realizados no modo positivo de ionização onde foram monitorados os metabólitos do guaco cumarina e dihidrocumarina. Neste método a 6-metilcumarina foi utilizada como padrão interno a fim de diminuir possíveis efeitos das matrizes na determinação destes metabólitos.

Devido à obtenção de uma excelente resposta da coluna Zorbax[®] (150 X 4.6 mm, 5 μ m) no método de CLAE-DAD, esta foi utilizada como fase estacionária nas primeiras injeções em CLAE-EM/EM. Para compor a fase móvel, apenas acetonitrila e água foram consideradas como eluente devido à baixa ionização dos compostos em metanol, observadas em estudos prévios ao desenvolvimento do método.

Dessa forma o primeiro ensaio foi realizado em uma fase móvel composta por uma mistura de acetonitrila/água 70:30 v/v (0,05% ácido fórmico), em modo isocrático de eluição. O fluxo foi mantido em 600 μ L min⁻¹, à temperatura ambiente sendo o cromatograma obtido apresentado na Figura 31. Conforme pode ser observado, além do tempo de retenção elevado da dihidrocumarina (9,3 min) houve formação de *splitting* nos picos cromatográficos. Na tentativa de melhorar o cromatograma a vazão de fluxo foi aumentada de 600 para 800 μ L min⁻¹ sendo observada uma redução de 25% no tempo de corrida, no entanto, com a permanência de uma resposta ruim no perfil dos picos cromatográficos, conforme demonstrado na Figura 32.

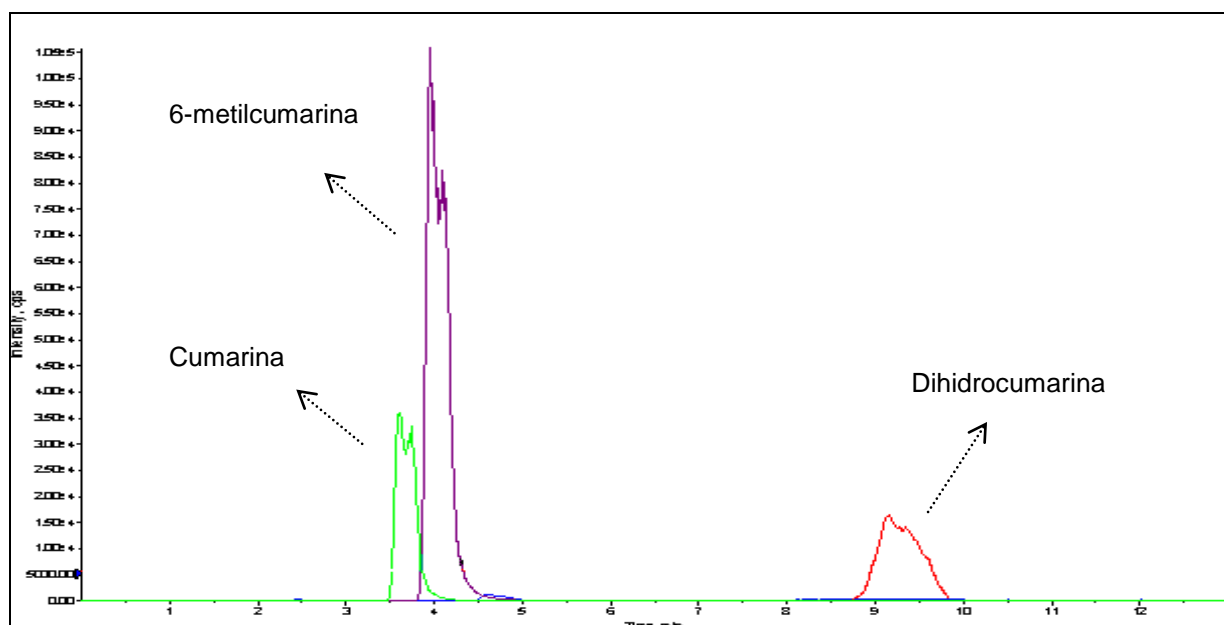


FIGURA 31 – CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE CUMARINA, 6-METILCUMARINA E DIHIDROOCUMARINA OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI+) UTILIZANDO COLUNA ZORBAX[®] NO DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO.

NOTA: Condições de análise: Fase móvel: acetonitrila/água 70:30 v/v (0,05% ácido fórmico); modo de eluição: isocrático; fluxo: 600 µL min⁻¹; temperatura de forno: 25 °C; volume de injeção: 10 µL.

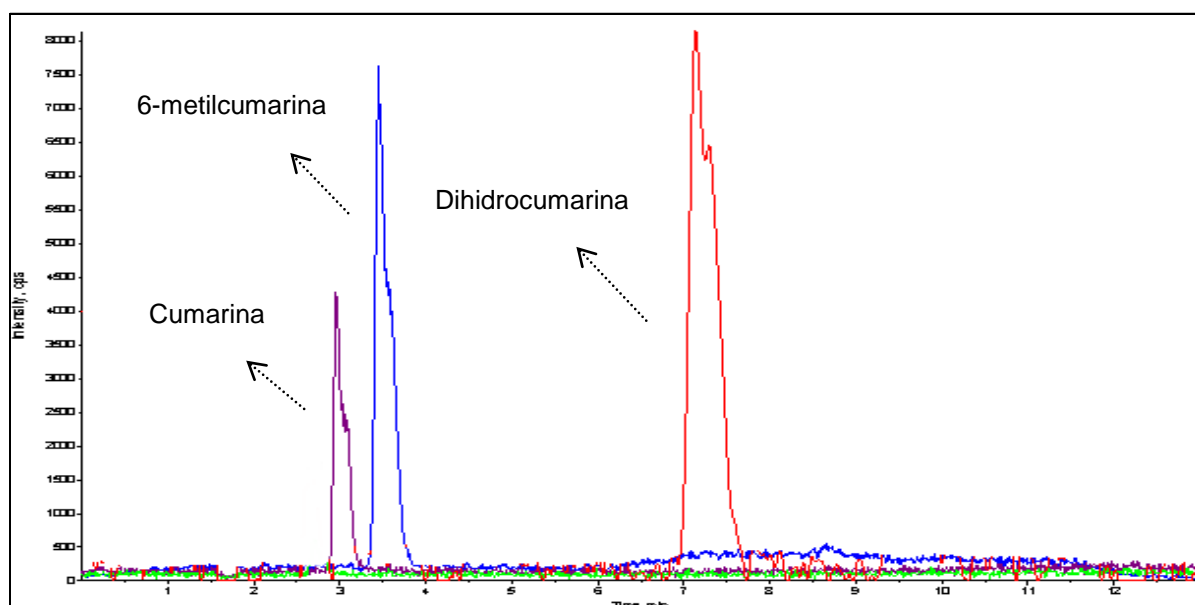


FIGURA 32 – CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE CUMARINA, 6-METILCUMARINA E DIHIDROOCUMARINA OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI+) UTILIZANDO COLUNA ZORBAX[®] EM UMA VAZÃO DE FLUXO DE 800 µL min⁻¹.

NOTA: Condições de análise: fase móvel: acetonitrila/água 70:30 v/v (0,05% ácido fórmico); modo de eluição: isocrático; fluxo: 800 µL min⁻¹; temperatura de forno: 25 °C; volume de injeção: 10 µL.

Em virtude da dificuldade de se obter um bom perfil cromatográfico com a coluna Zorbax®, esta foi substituída pela XBridge® de mesmo comprimento, diâmetro e tamanho de partícula. Para fins comparativos, inicialmente as análises foram realizadas nas mesmas condições da coluna Zorbax®, sendo o cromatograma obtido apresentado na Figura 33.

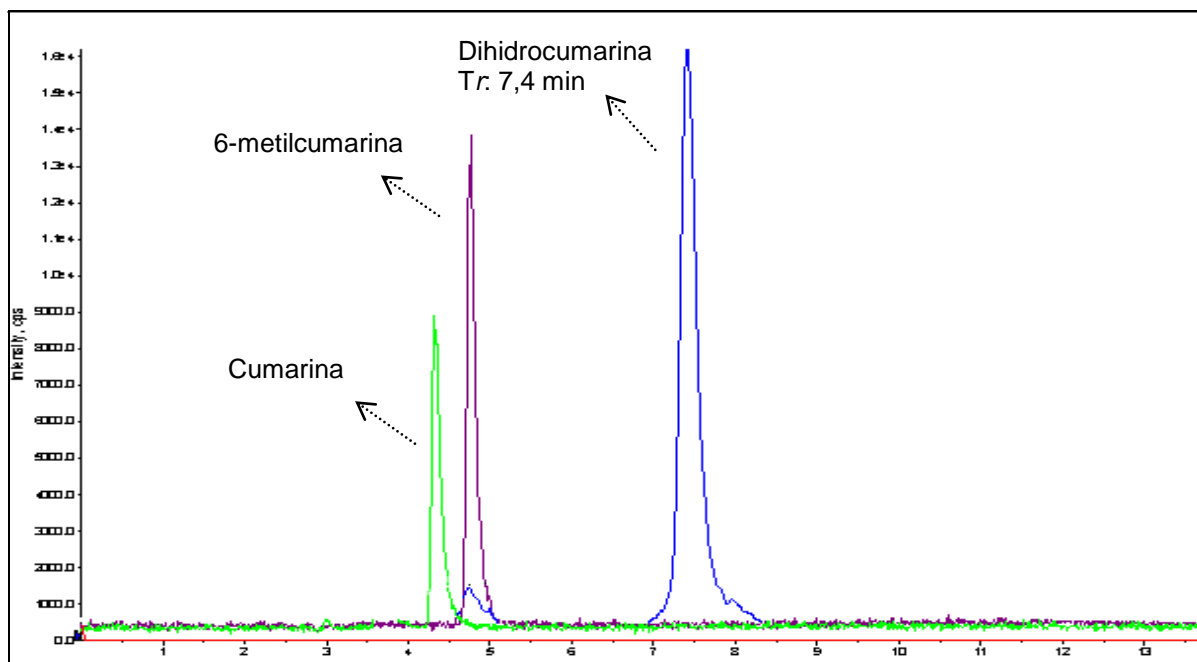


FIGURA 33 – CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE CUMARINA, 6-METILCUMARINA E DIHIDROCUMARINA OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI+) UTILIZANDO COLUNA XBRIDGE® (150 X 4.6 mm) NO DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO.

NOTA: Condições de análise: Fase móvel: acetonitrila/água 70:30 v/v (0,05% ácido fórmico); modo de eluição: isocrático; fluxo: 600 $\mu\text{L min}^{-1}$; temperatura de forno: 25 °C; volume de injeção: 10 μL .

De acordo com o cromatograma apresentado na Figura 33, a substituição da coluna Zorbax® pela XBridge® melhorou consideravelmente o perfil dos picos cromatográficos com uma vantagem de redução no tempo de corrida de aproximadamente dois minutos em relação ao obtido com a coluna Zorbax® nas mesmas condições de análise.

Apesar dos bons resultados e da boa performance obtida com a coluna XBridge® 150 x 4.6 mm, com o intuito de ganhos ainda maiores no perfil cromatográfico e no tempo de corrida esta foi substituída por uma coluna de mesma marca e tamanho, porém com diâmetro menor (150 x 2.1 mm). As análises foram

realizadas nas mesmas condições da coluna de diâmetro maior, porém com uma vazão de fluxo de $150 \mu\text{L min}^{-1}$.

Após as primeiras injeções foi verificado um tempo de eluição da dihidrocumarina maior que 20 minutos, tornando inviável sua análise devido ao extenso tempo de corrida. Dessa forma um gradiente de eluição foi realizado aumentando a proporção de acetonitrila de 70 para 90% durante a corrida analítica. Através desse experimento foi verificada uma melhora significativa na sensibilidade, no tempo de corrida e no perfil cromatográfico dos analitos, conforme demonstrado na Figura 34. Além de tudo com a redução drástica na vazão de fluxo a análise tornou-se mais econômica e ecológica.

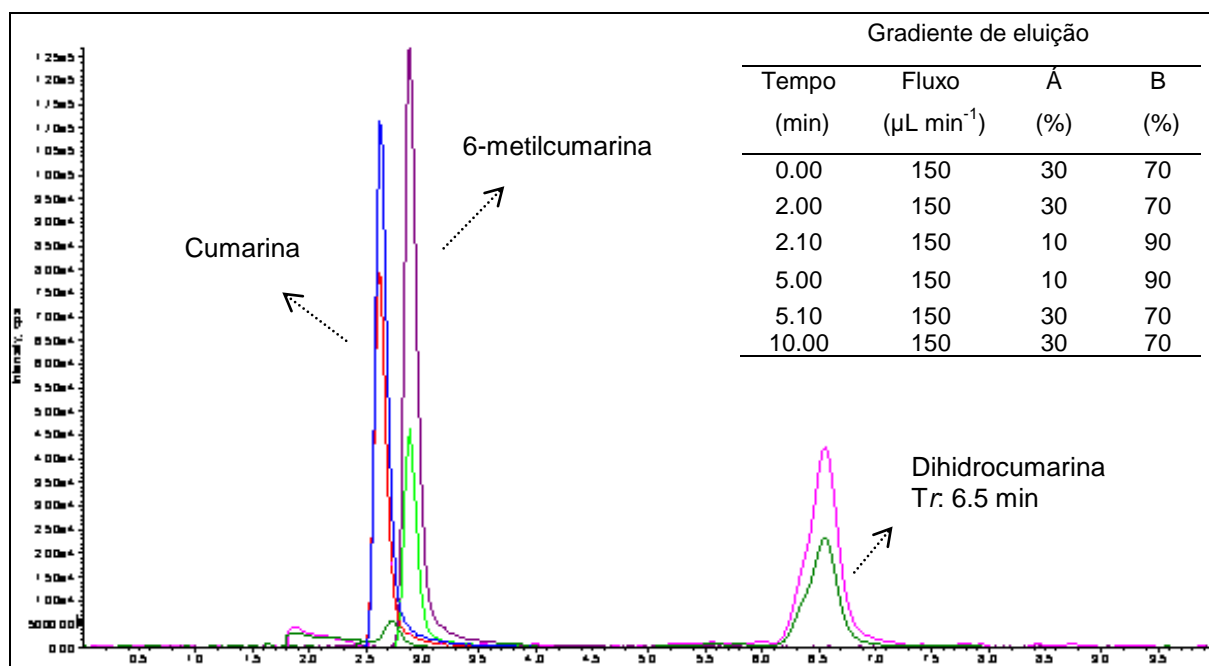


FIGURA 34 – CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE CUMARINA, 6-METILCUMARINA E DIHIDROCUMARINA UTILIZANDO COLUNA XBRIDGE[®] (150 X 2.1 mm) NO DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO.

NOTA: Condições de análise: Fase móvel: A%: Água (0,05% ácido fórmico), B%: Acetonitrila (0,05% ácido fórmico); Temperatura de forno: 25 °C; Volume de injeção: 10 μL .

Na tentativa de obter um tempo de corrida ainda menor, diferentes vazões de fluxo foram testadas (200 e 250 $\mu\text{L min}^{-1}$) sendo os cromatogramas obtidos apresentados na Figura 35.

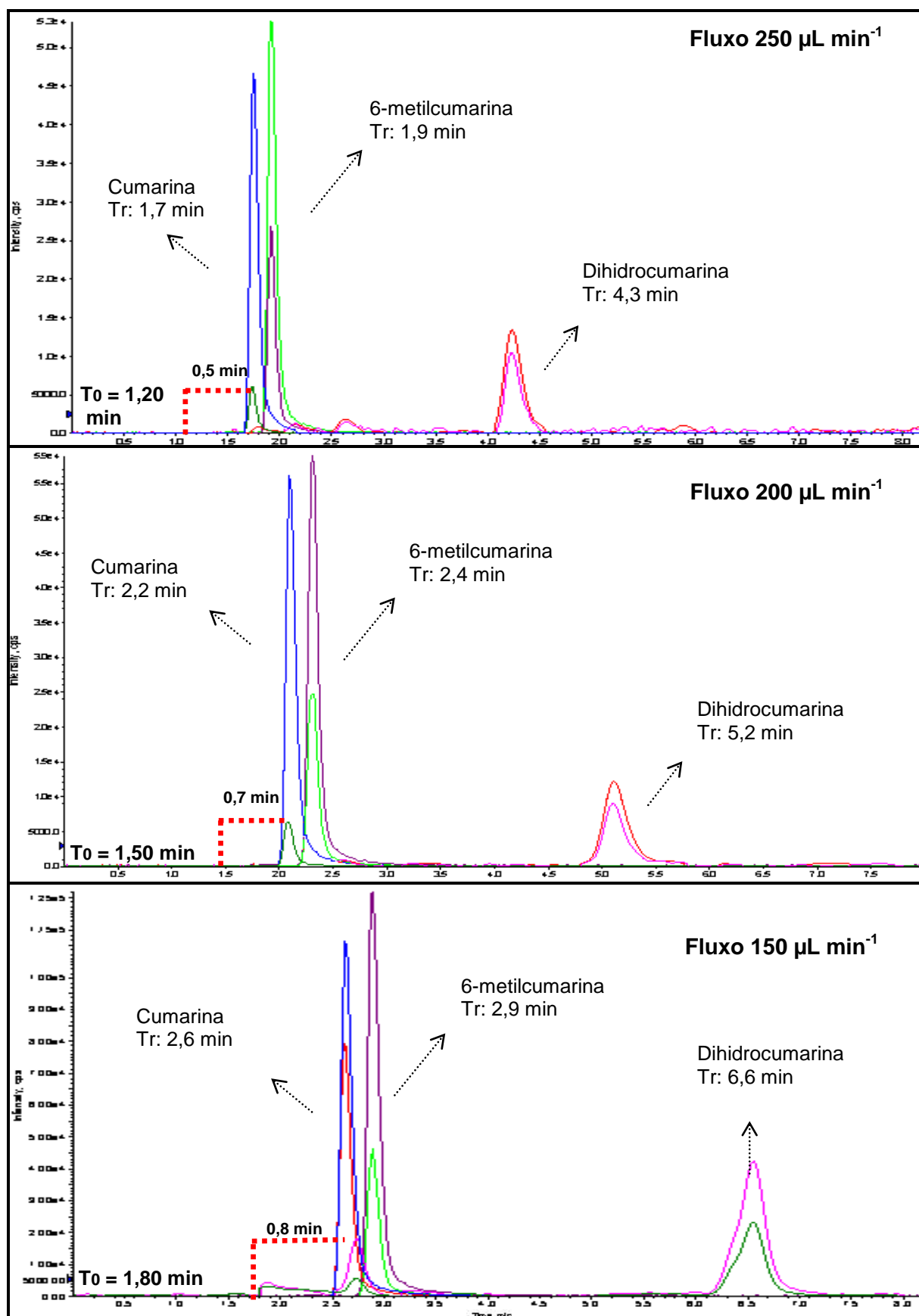


FIGURA 35: CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE CUMARINA, 6-METILCUMARINA E DIHIDROOCUMARINA OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI+) UTILIZANDO DIFERENTES VAZÕES DE FLUXO.

Através da sobreposição dos cromatogramas foi possível verificar que um aumento de $50 \mu\text{L min}^{-1}$ na vazão do fluxo diminui consideravelmente o tempo de eluição dos compostos. Nesse sentido o fluxo de $250 \mu\text{L min}^{-1}$ seria a melhor escolha se não fosse a proximidade do pico da cumarina com o tempo morto (distância de 0,50 min). Dessa forma o fluxo de $200 \mu\text{L min}^{-1}$ foi o escolhido, pois além de reduzir em 1,4 minutos o tempo de corrida, manteve uma distância do tempo morto em 0,7 minutos, o que garante segurança quanto aos efeitos de supressão passíveis de ocorrência em análises de matrizes mais complexas.

4.2.1.2.2 Modo negativo de ionização

Os primeiros ensaios para o desenvolvimento do método no modo negativo de ionização foram realizados em modo isocrático de eluição através de uma fase móvel composta de 30:70 v/v água e solução acetonitrila/água 97:3 v/v (5mM de formiato de amônio). A vazão de fluxo foi de $200 \mu\text{L min}^{-1}$ sendo a temperatura de forno mantida ambiente. Em virtude dos bons resultados obtidos com a coluna XBridge (150 x 2.1 mm), esta foi utilizada durante todo o desenvolvimento do método.

Para a escolha do padrão interno inicialmente dois compostos foram avaliados: ácido cinâmico e ácido benzóico. Em injeções individuais destes compostos foi verificada uma baixa fragmentação e por consequência, uma baixa intensidade no sinal do ácido cinâmico. O ácido benzóico por sua vez teve moderada fragmentação, sendo este, portanto utilizado durante os primeiros ensaios no desenvolvimento do método.

Uma vez escolhido o padrão interno, este foi injetado em CLAE-EM/EM juntamente com os padrões analíticos de ácido o-cumárico, ácido caurenóico e siringaldeído. Após as primeiras injeções foi verificado que nas condições inicialmente estabelecidas o ácido benzóico elui no tempo morto (1,5 min), comprometendo dessa forma a análise dos compostos (Figura 36). Além disso, não foi verificada a presença do ácido caurenóico em período inferior a 40 minutos.

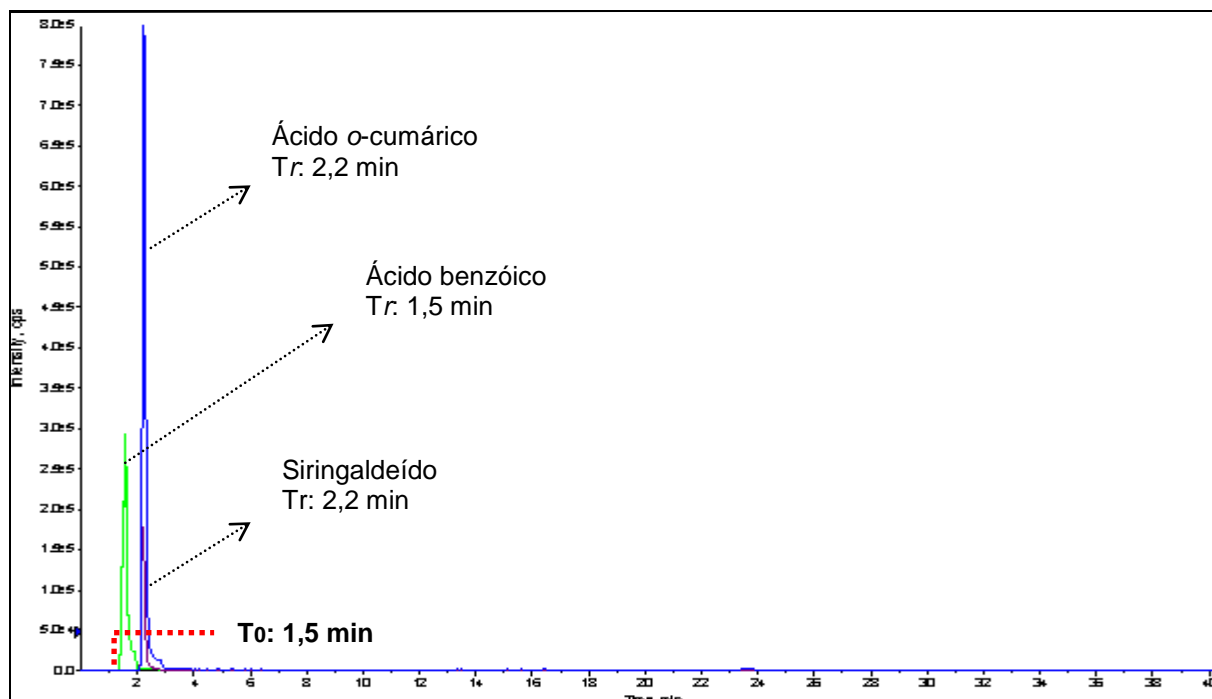


FIGURA 36 – CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE ÁCIDO BENZÓICO, ÁCIDO CAURENÓICO, ÁCIDO O-CUMÁRICO E SIRINGALDEÍDO OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO MODO ISOCRÁTICO DE ELUIÇÃO.

NOTA: Condições de análise: Fase móvel: 30:70 v/v água e solução acetonitrila/água 97:3 v/v (5 mM formiato de amônio); Temperatura de forno: 25 °C; Volume de injeção: 10 µl.

Mediante este primeiro ensaio, a porcentagem de água da fase móvel foi aumentada de 30 para 65% no início da corrida. Além disso, um gradiente aumentando a proporção de acetonitrila na fase móvel (35 para 95%) foi realizado durante a corrida analítica a fim de eluir o ácido caurenóico em um tempo menor de retenção.

Ao término das otimizações, o aumento na proporção de água no início da corrida analítica fez com que o ácido benzóico sofresse um deslocamento de 1,5 para 2,3 minutos, tempo este considerado ótimo para reprodutibilidade do método (Figura 37). Bons resultados também foram observados utilizando gradiente de eluição durante a corrida analítica, com um tempo de retenção do ácido caurenóico otimizado em 10 minutos, conforme ilustrado na Figura 37.

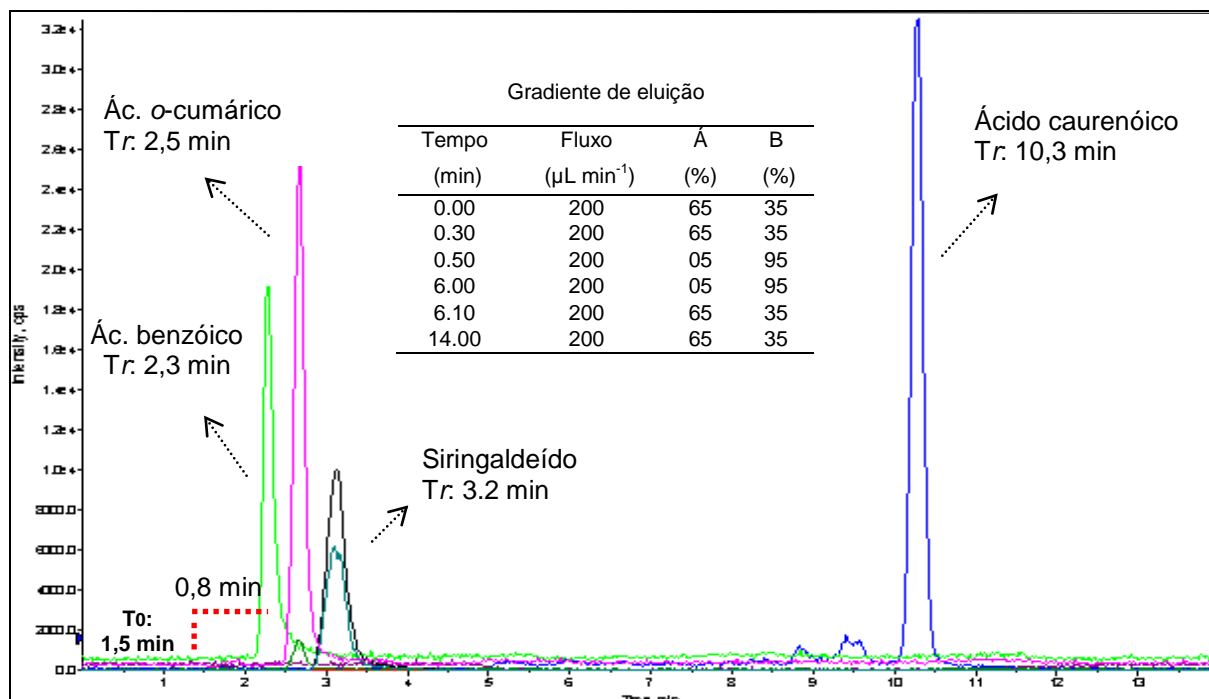


FIGURA 37 - CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE ÁCIDO BENZÓICO, ÁCIDO CAURENÓICO, ÁCIDO O-CUMÁRICO E SIRINGALDEÍDO OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO MODO DE ELUIÇÃO GRADIENTE.

NOTA: Condições de análise: Fase móvel: A%: Água (5mM formiato de amônio), B%: Solução acetonitrila/água 97:3 v/v (5 mM formiato de amônio); Temperatura de forno: 25 °C; Volume de injeção: 10 μL.

Em virtude dos bons resultados, o método foi aplicado às formas farmacêuticas para avaliar possíveis efeitos das matrizes. Para tanto, as amostras de xarope e solução oral foram injetadas em CLAE-EM/EM sendo os cromatogramas avaliados. Ao final das injeções foi constatado que em nove das doze amostras analisadas o padrão interno sofreu influência da matriz (Figura 38). A partir de então algumas tentativas para diminuir essa influência foram realizadas como, aumento de água na composição da fase móvel, tratamento das amostras através de extração em fase sólida (SPE), e tratamento das amostras através de partição líquido-líquido com diclorometano.

Em resumo aos diferentes tratamentos aplicados às amostras, o aumento de água na composição da fase móvel diminuiu consideravelmente a sensibilidade dos compostos sendo inviável sua utilização. Extrações tanto em fase sólida quanto em partição líquido-líquido demonstraram perdas na recuperação dos metabólitos, tornando além de tudo o método mais oneroso e laborioso.

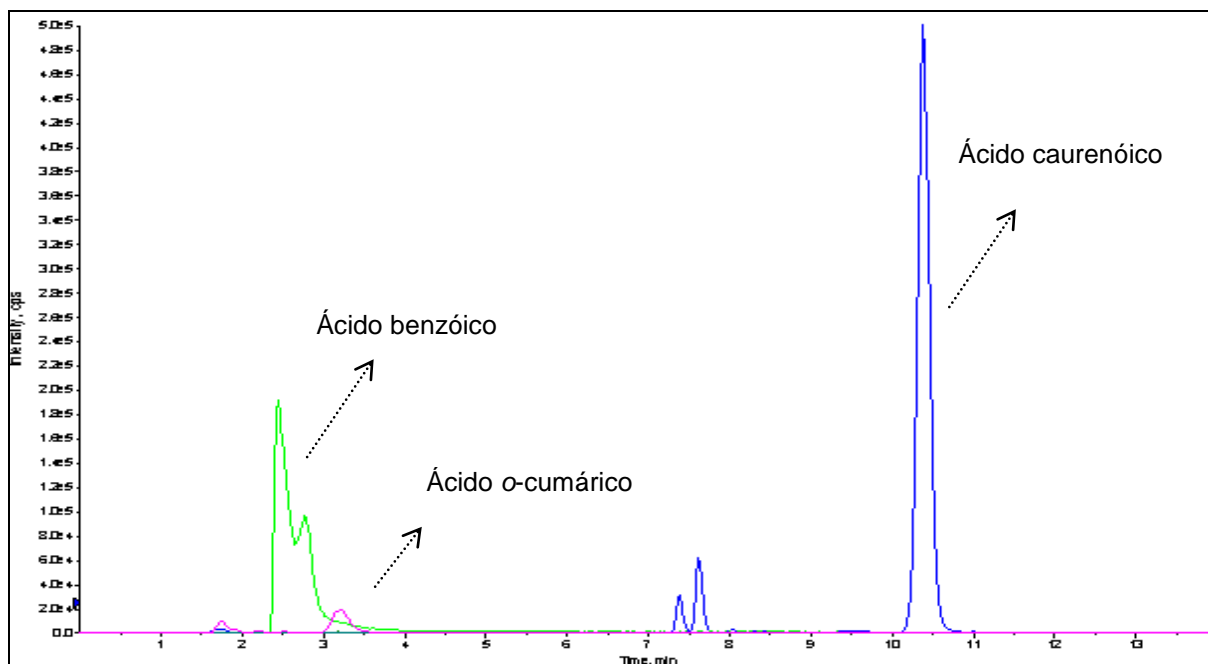


FIGURA 38 – CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE XAROPE DE GUACO FORTIFICADA COM ÁCIDO BENZÓICO OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI -).

Em consequência destas dificuldades, novos padrões internos como ácido salicílico, ácido cafêico e prednisona foram testados nas amostras mais críticas, nas mesmas condições do ácido benzóico. Após as injeções em CLAE-EM/EM foi constatado que mantendo as condições de análise o ácido salicílico elui no tempo morto sendo inviável seu uso. Para que este analito tivesse um tempo de retenção adequado, seria necessário aumentar a proporção de água na composição da fase móvel, e conforme mencionado, o aumento de água no sistema diminui a sensibilidade de detecção dos compostos, não sendo possível dessa forma utilizar este composto como padrão interno.

O ácido cafêico por sua vez ficou retido em aproximadamente 2,3 minutos, tempo este muito próximo ao do ácido benzóico. Embora o tempo de retenção deste composto fosse adequado, a influência da matriz em algumas amostras também foi observada. Em contrapartida a prednisona (T_r 4,05 minutos) demonstrou-se a mais apropriada para uso como padrão interno dentre todos os compostos avaliados. Além de um tempo ótimo de retenção, apresentou boa intensidade de sinal, um excelente perfil cromatográfico, sem sofrer influência das matrizes, conforme visualizado na Figura 39.

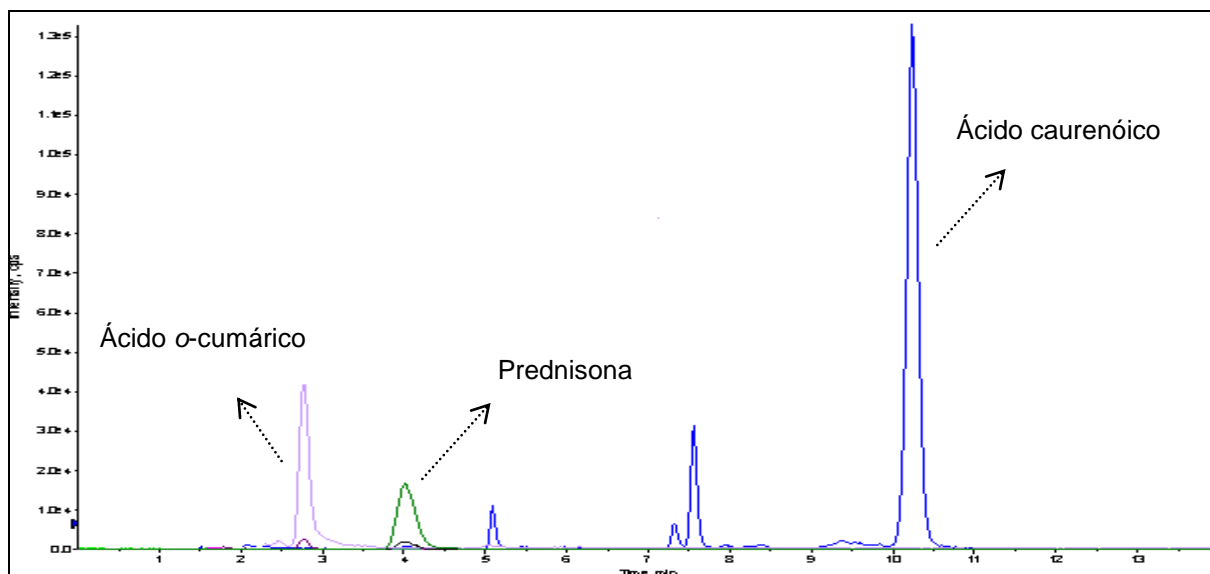


FIGURA 39 - CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE XAROPE DE GUACO FORTIFICADA COM PREDNISONA OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI-).

Com um maior tempo de retenção, a prednisona permitiu um aumento de 10% na vazão de fluxo ($220 \mu\text{L min}^{-1}$) reduzindo dessa forma em dois minutos o reequilíbrio da coluna, sem comprometer os metabólitos na região de efeito da matriz. O cromatograma obtido ao término das otimizações é apresentado na figura abaixo:

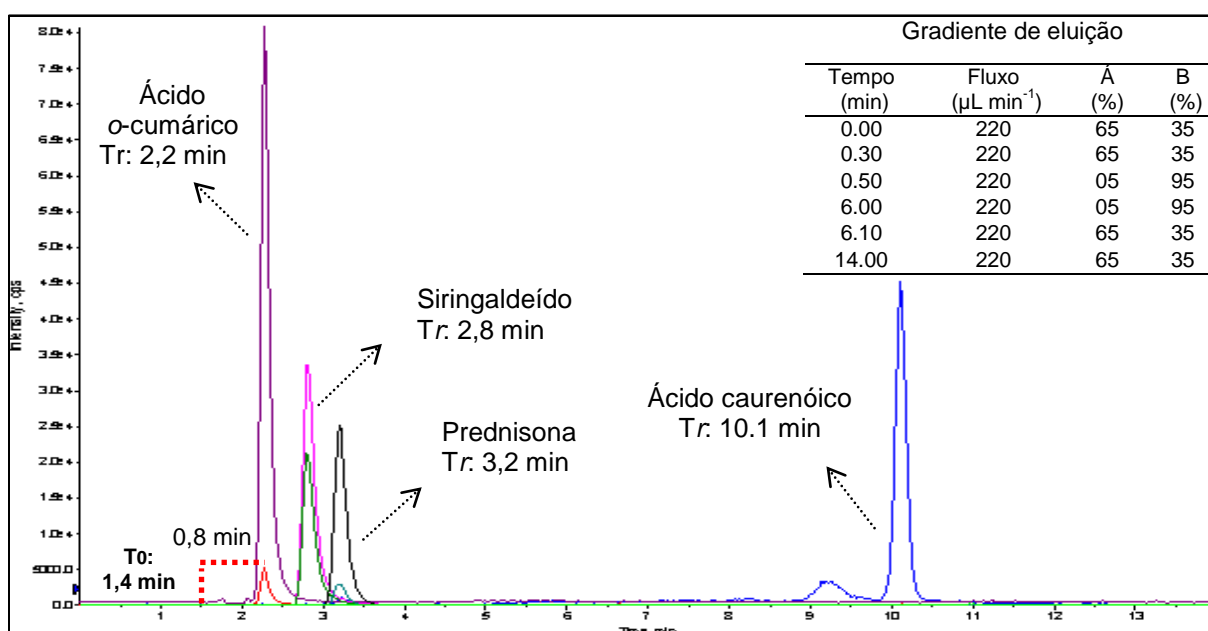


FIGURA 40 – CROMATOGRAMA DA PREDNISONA, ÁCIDO CAURENÓICO, ÁCIDO O-CUMÁRICO E SIRINGALDEÍDO OBTIDO APÓS AS OTIMIZAÇÕES DO MÉTODO (ESI-).

NOTA: Condições de análise: Fase móvel: A%: Água (5mM formiato de amônio), B%: Solução acetonitrila/água 97:3 v/v (5 mM formiato de amônio); Temperatura de forno: 25 °C

Em virtude das excelentes otimizações obtidas nos dois modos de ionização, a próxima etapa foi a validação dos métodos desenvolvidos.

4.2.2 Validação dos métodos de CLAE-EM/EM

Os métodos através de CLAE-EM/EM foram validados de acordo com a resolução publicada pela ANVISA a RE nº 899/03, porém com modificações. Para métodos desenvolvidos em equipamentos sensíveis como o espectrômetro de massas as variações aceitas para o ensaio de precisão podem chegar a 10% enquanto que no ensaio de exatidão 5%. Além disso, a robustez não é necessária neste tipo de equipamento, pois quaisquer modificações nos parâmetros podem comprometer significativamente a análise dos compostos. Portanto, os parâmetros avaliados foram: especificidade, limites de detecção e quantificação, linearidade, intervalo, precisão (intra-corrida e inter-corridas) e exatidão.

4.2.2.1 Seletividade

Para realizar o ensaio de seletividade, matrizes de xarope e de solução oral isentas dos metabólitos de interesse foram injetadas em CLAE-EM/EM nos dois modos de ionização. Os cromatogramas das matrizes foram sobrepostos aos obtidos com padrões analíticos e por fim comparados.

Através das Figuras 41 e 42, é possível verificar a ausência de interferência significativa nos tempos de retenção dos metabólitos e dos padrões internos, sendo, portanto os métodos considerados seletivos.

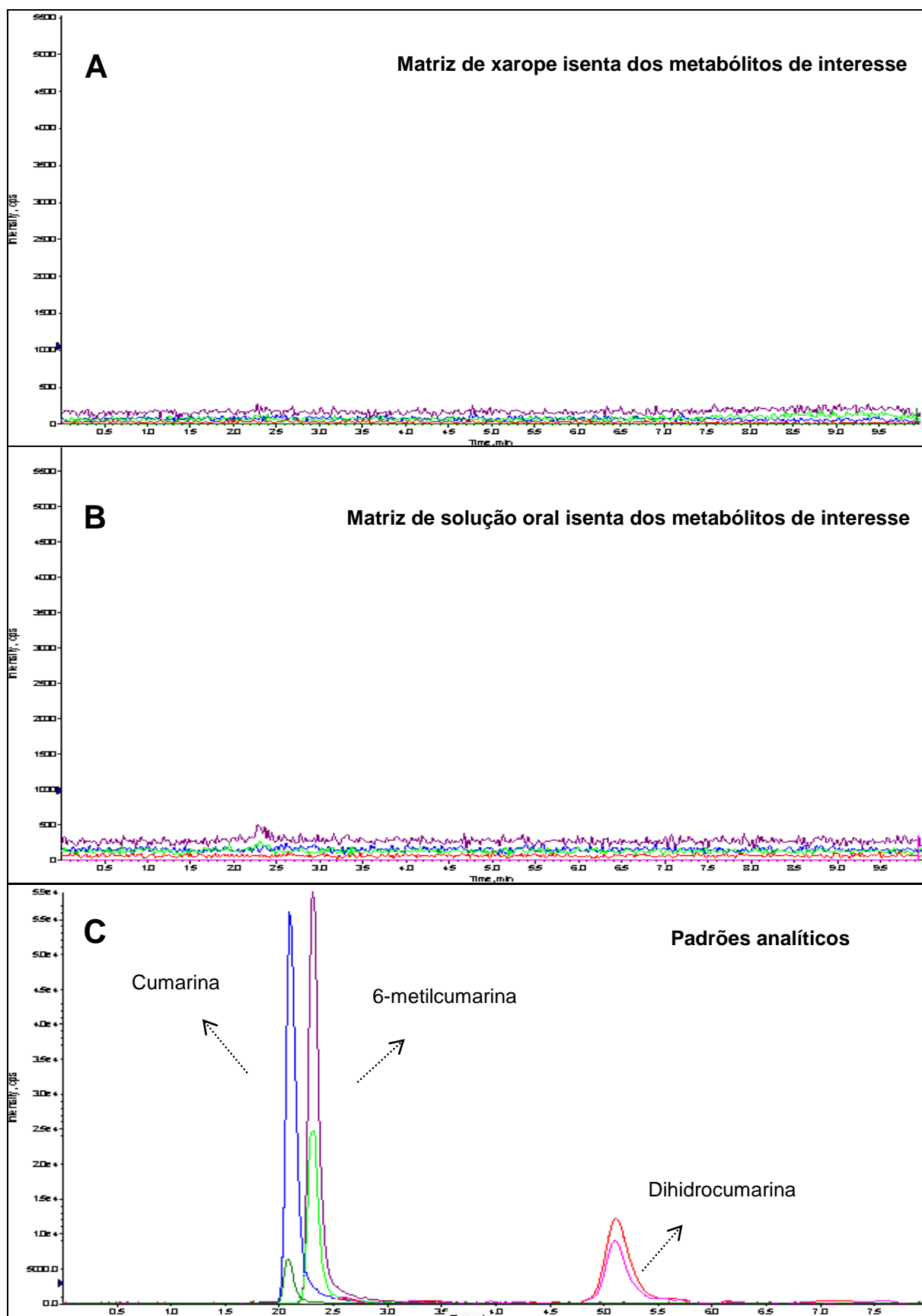


FIGURA 41 – CROMATOGRAMA DA MATRIZ DE XAROPE (A), DA MATRIZ DE SOLUÇÃO ORAL (B) E DOS PADRÕES DE CUMARINA, 6-METILCUMARINA E DIHIDROCUMARINA (C) OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI+).

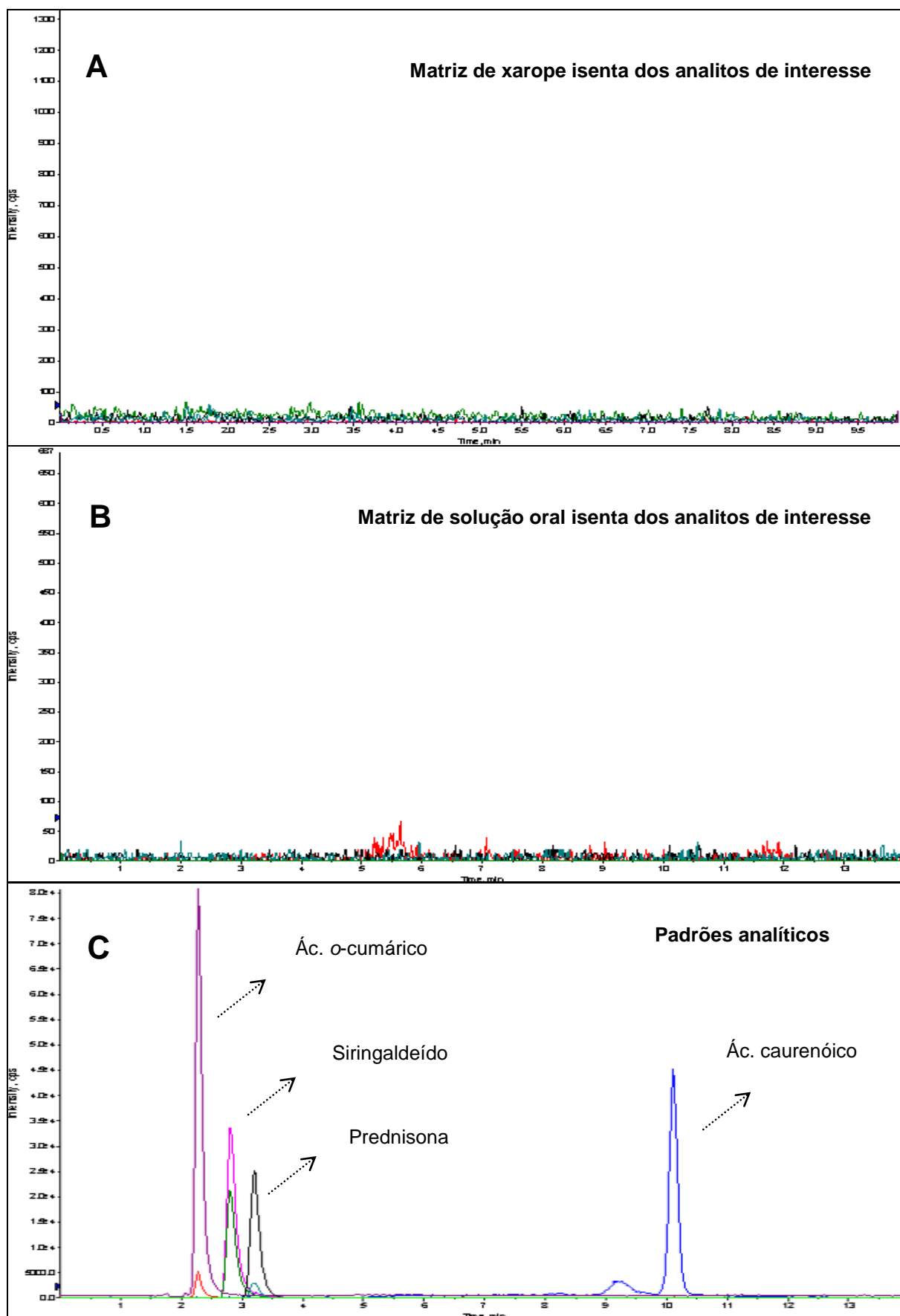


FIGURA 42 - CROMATOGRAMA DA MATRIZ DE XAROPE (A), DA MATRIZ DE SOLUÇÃO ORAL (B) E DOS PADRÕES DE ÁCIDO O-CUMÁRICO, SIRINGALDEÍDO, ÁCIDO CAURENÓICO E PREDNISONA (C) OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI-).

4.2.2.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

LD e LQ foram estimados a partir da relação sinal/ruído e para tanto uma triplicata de soluções de 1000 ng mL^{-1} de cada composto foram diluídas de forma seriada e injetadas em CLAE-EM/EM até a obtenção do menor pico detectável.

LD foi baseado na relação de pelo menos três vezes a altura do ruído da linha base enquanto que LQ de no mínimo 10 vezes com precisão e exatidão dentro dos critérios estabelecidos pelo laboratório. Os resultados do limite de detecção e do limite de quantificação encontram-se dispostos na Tabela 30.

TABELA 30 – RESULTADOS DOS LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CUMARINA, ÁCIDO O-CUMÁRICO, ÁCIDO CAURENÓICO, SIRINGALDEÍDO E DIHIDROCUMARINA EM CLAE-EM/EM.

Compostos	Parâmetro de validação	Concentração (ng mL^{-1})	Sinal /ruído
Cumarina	LD	0,5	5,9
	LQ	1,25	10,0
Ácido o-cumárico	LD	10,0	3,8
	LQ	25,0	10,6
Siringaldeído	LD	5,0	3,2
	LQ	25,0	16,8
Dihidrocumarina	LD	2,5	3,8
	LQ	10,0	16,0
Ácido caurenóico	LD	1,0	3,6
	LQ	5,0	16,4

NOTA: LD: Limite de detecção e LQ: Limite de quantificação.

4.2.2.3 Linearidade e intervalo

4.2.2.3.1 Linearidade

A linearidade foi determinada em nove níveis de concentração, contemplando as faixas de 1,25 a 400 ng mL⁻¹ para cumarina, 10 a 600 ng mL⁻¹ para dihidrocumarina, 5 a 250 ng mL⁻¹ para o ácido caurenóico e 25 a 500 ng mL⁻¹ para siringaldeído e ácido o-cumárico. Os padrões analíticos foram injetados utilizando método adequado de acordo com a característica de ionização de cada composto.

As curvas de calibração foram construídas automaticamente pelo software Analyst versão 1.4.2 plotando as áreas dos analitos / área do padrão interno *versus* a concentração dos analitos em cada nível / concentração do padrão interno. A linearidade foi obtida através da análise de regressão linear 1/X a qual foi calculada através do método dos quadrados mínimos.

Devido à alta sensibilidade deste tipo de equipamento, as variações de precisão em cada nível de concentração podem chegar a 10%. Além disso, a exatidão é o parâmetro utilizado para verificar a aceitabilidade de cada ponto das curvas de calibração, devendo esta permanecer entre 90 e 110%. Portanto, não foi necessário traçar os limites de predição e de confiança neste estudo. Apenas a análise de variância de resíduos (nível de 95%) foi aplicada para validar a regressão, calcular as incertezas ao longo da curva de calibração e verificar a aceitabilidade do modelo linear utilizado. Os valores experimentais de precisão e exatidão são apresentados nas Tabelas 31 e 32, enquanto a regressão linear de cada composto nas Figuras 43, 44, 45, 46 e 47.

TABELA 31 - VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS NO ESTUDO DA LINEARIDADE DO MÉTODO DE CLAE-EM/EM (ESI+).

Compostos	Concentração esperada (ng mL ⁻¹)	Concentração determinada (ng mL ⁻¹)	Desvio padrão	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
Cumarina	1,25	1,34	0,073	5,05	108,43
	2,50	2,51	0,096	3,81	100,34
	5,00	4,83	0,137	2,82	96,73
	10,00	9,09	0,369	4,06	90,86
	25,00	23,75	1,582	6,66	95,01
	50,00	49,51	0,874	1,77	99,02
	100,00	102,28	4,053	3,96	102,28
	200,00	202,63	7,483	3,69	101,31
	400,00	393,35	23,815	6,05	98,34
Dihidrocumarina	10,0	10,65	0,291	2,30	100,41
	25,0	26,23	0,677	2,58	104,52
	50,0	50,73	3,799	7,49	100,86
	75,0	69,27	5,892	8,51	91,87
	100,0	108,33	4,033	3,72	107,26
	150,0	140,83	3,436	2,44	93,27
	200,0	199,74	5,007	2,51	99,37
	400,0	415,42	28,576	6,88	103,34
	600,0	598,81	54,191	9,05	99,31

NOTA: n=3.

TABELA 32 - VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS NO ESTUDO DA LINEARIDADE DO MÉTODO DE CLAE-EM/EM (ESI-).

Compostos	Concentração esperada (ng mL ⁻¹)	Concentração determinada (ng mL ⁻¹)	Desvio padrão	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
Ácido o-cumárico	25,0	25,96	0,866	3,33	103,85
	50,0	50,85	2,138	4,21	101,69
	75,0	73,19	0,809	1,11	97,59
	100,0	92,56	0,325	0,35	92,56
	150,0	145,59	2,212	1,52	97,06
	200,0	216,11	2,685	1,24	108,05
	300,0	303,48	2,539	0,85	101,16
	400,0	403,72	7,517	1,86	100,92
	500,0	493,15	13,711	2,78	98,63
Ácido caurenóico	5,0	5,28	0,181	3,43	105,67
	10,0	9,41	0,357	3,79	94,10
	25,0	27,05	0,778	2,88	108,21
	50,0	47,33	1,001	2,11	94,67
	75,0	74,50	1,355	1,82	99,33
	100,0	96,98	3,044	3,14	96,98
	150,0	142,92	9,547	6,68	95,28
	200,0	211,57	4,134	1,95	105,78
	250,0	249,96	4,182	1,67	99,98
Siringaldeído	25,0	27,86	0,494	1,77	107,84
	50,0	50,12	1,857	3,70	100,31
	75,0	70,52	0,676	0,96	94,03
	100,0	93,13	2,913	3,13	93,13
	150,0	142,05	4,050	2,85	94,70
	200,0	205,96	13,536	6,57	102,98
	300,0	303,14	18,455	6,08	101,05
	400,0	418,77	9,850	2,35	104,69
	500,0	488,42	29,298	6,00	97,68

NOTA: n=3.

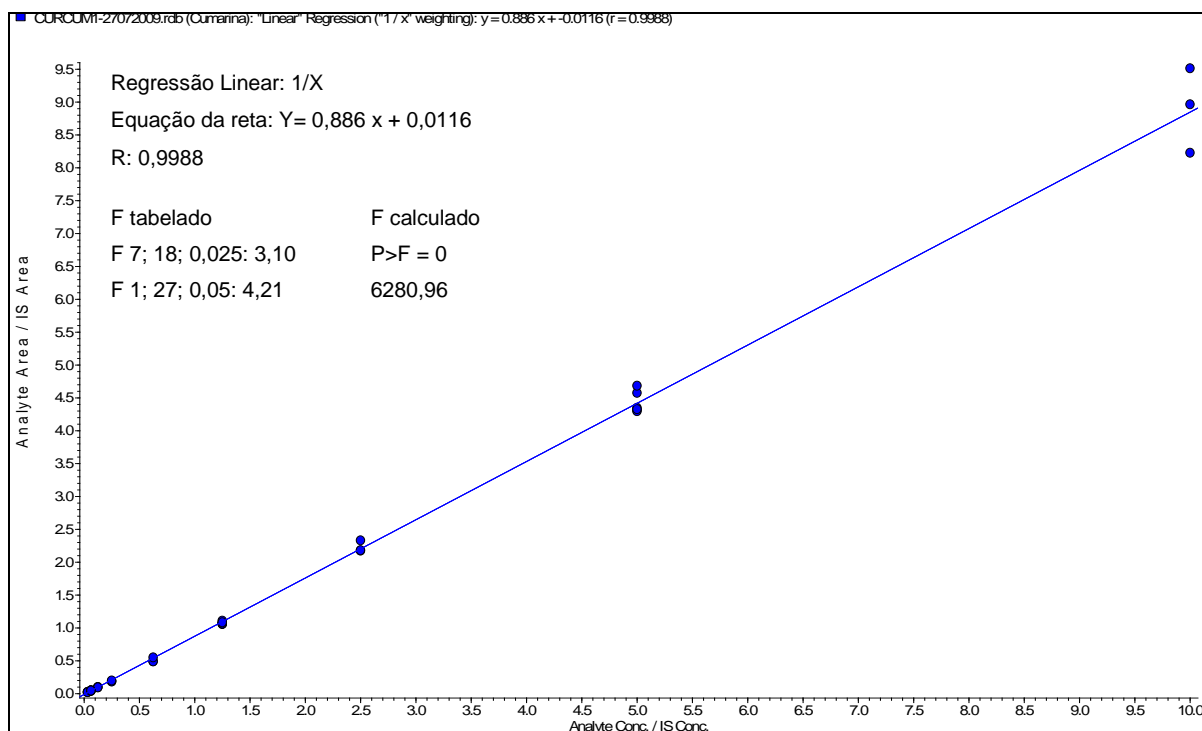


FIGURA 43 – GRÁFICO DA LINEARIDADE DA CUMARINA OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM.

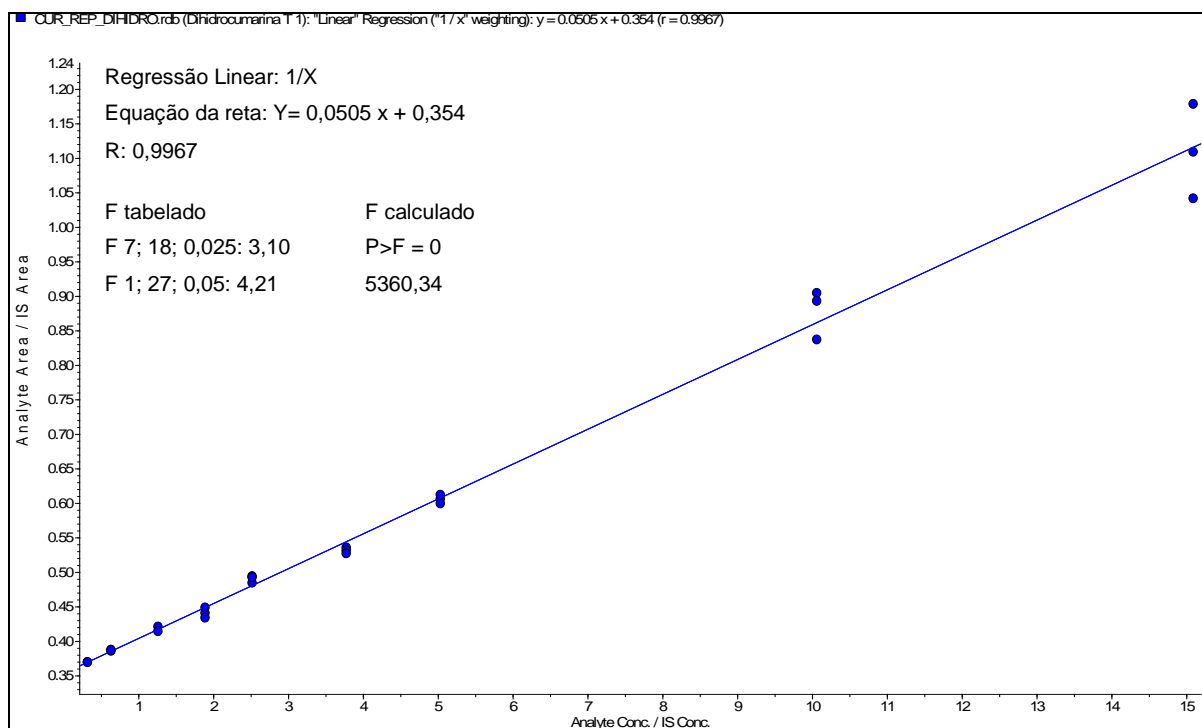


FIGURA 44 – GRÁFICO DA LINEARIDADE DA DIHIDROCUMARINA OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM.

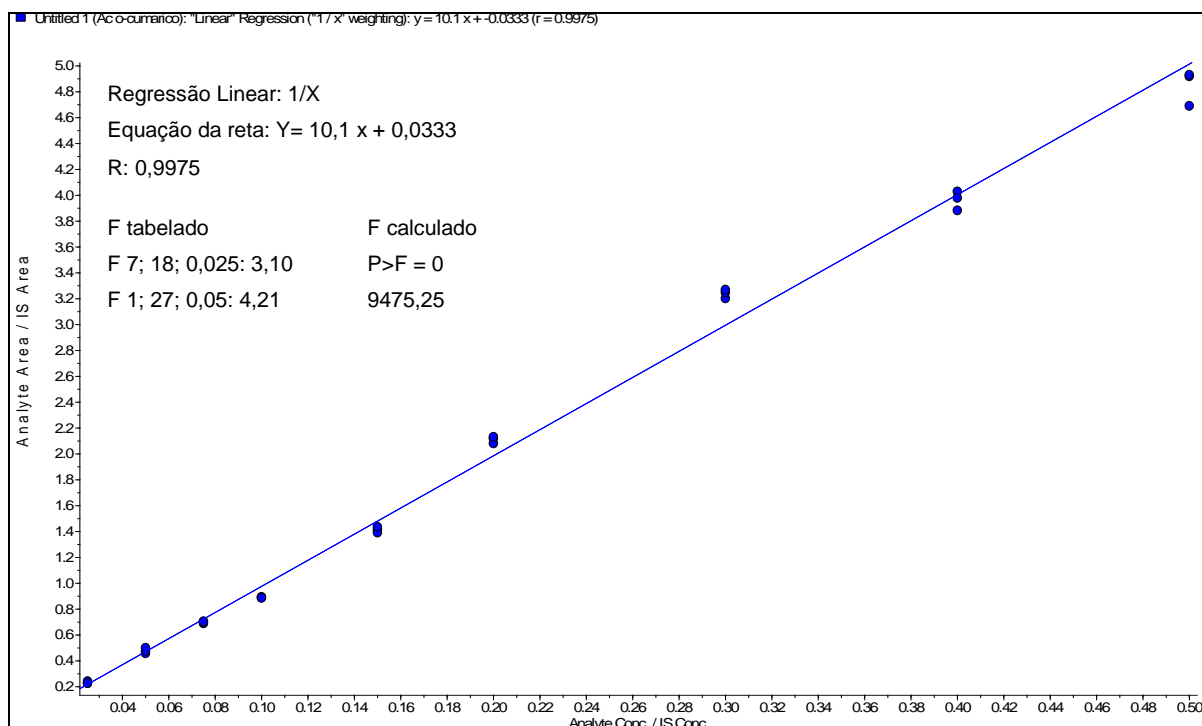


FIGURA 45 – GRÁFICO DA LINEARIDADE DO ÁCIDO O-CUMÁRICO OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM.

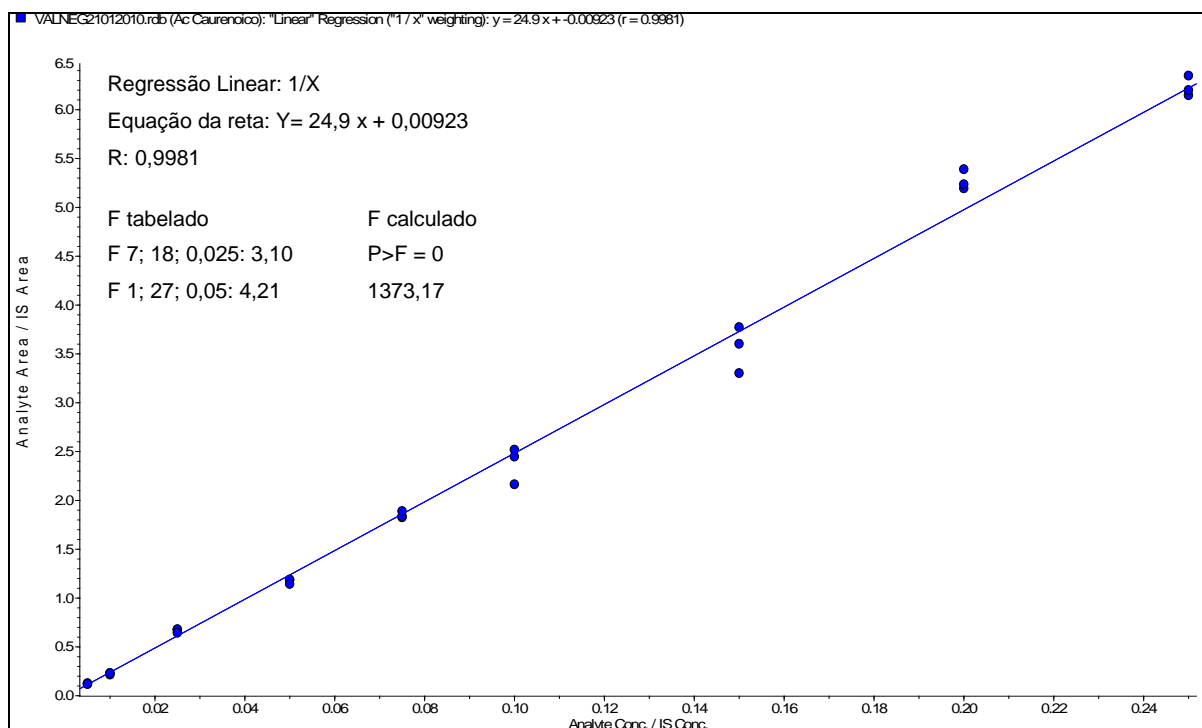


FIGURA 46 – GRÁFICO DA LINEARIDADE DO ÁCIDO CAURENÓICO OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM.

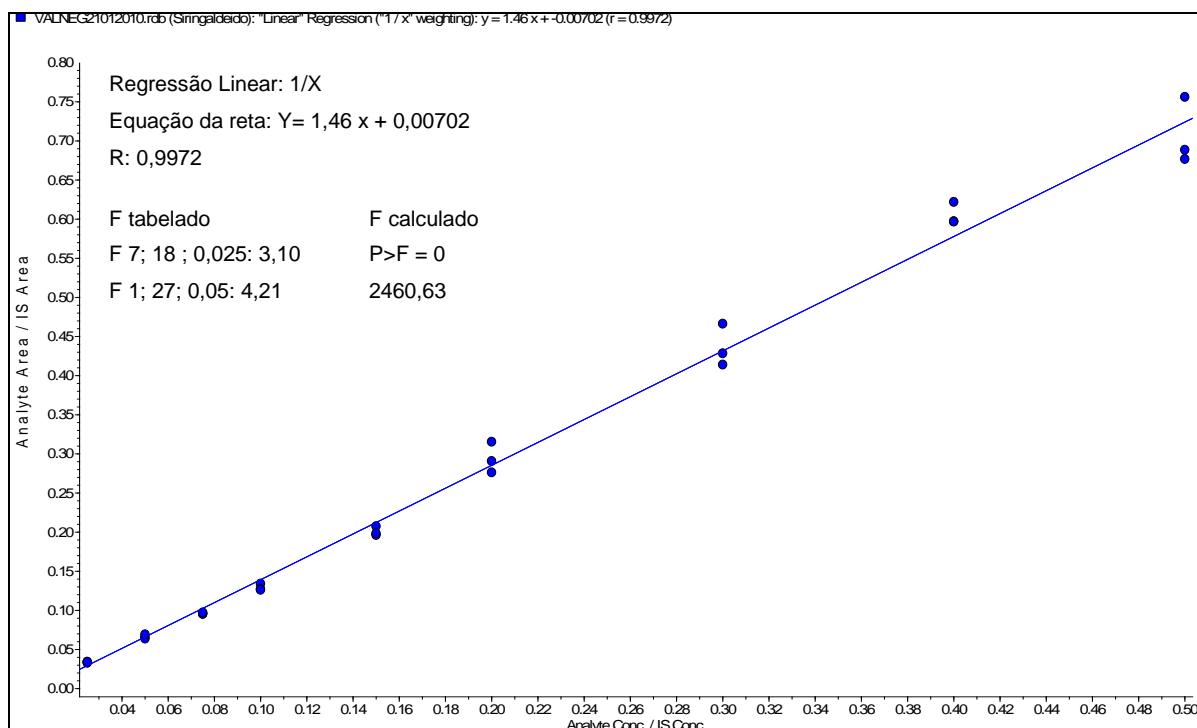


FIGURA 47 – GRÁFICO DA LINEARIDADE DO SIRINGALDEÍDO OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM.

Conforme demonstrado nas Figuras 43, 44, 45, 46 e 47 para os cinco compostos em estudo a linearidade foi aceita através do teste de ajuste do modelo linear com valores nulos (zero) de probabilidade de $F \geq F$ crítico tabelado (QUEENIE; CHUI; ZUCCHINI, 2000; SANTOS *et. al.*, 2003). Portanto as variações ocorridas entre as áreas de um mesmo nível da curva (eixo y) são independentes dos níveis de concentração (eixo x) sendo dessa forma o modelo linear utilizado adequado para análise destes compostos. Além disso, os testes de validade de regressão apresentaram valores de F de 6281 para cumarina, 9475 para o ácido o-cumárico, 2461 para o siringaldeído, 1373 para o ácido caurenóico e 5360 para a dihidrocurmarina, ou seja, valores muito superiores ao F crítico tabelado de 4,21. Dessa forma pode-se afirmar que as inclinações das retas de regressão são significativas, indicando, portanto existência de relação linear entre as variáveis dependentes y (áreas) e independentes x (concentração) (QUEENIE; CHUI; ZUCCHINI, 2000; SANTOS *et. al.*, 2003)

Os métodos também demonstraram grande eficiência da regressão com valores de $R > 0,9967$ para todos os compostos. A precisão e a exatidão também

foram comprovadas nas cinco curvas de calibração com variações menores que 10% em todos os níveis de concentração, conforme observado nas Tabelas 31 e 32.

Em virtude dos resultados obtidos, pode-se inferir que dentro das faixas de concentração estabelecidas, os métodos desenvolvidos garantem uma resposta linear precisa e exata para todos os compostos.

4.2.2.3.2 Intervalo de trabalho

O intervalo de trabalho é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (BRASIL, 2003a).

Para compor os limites superior e inferior de quantificação dos métodos, os intervalos de trabalho foram os seguintes: Cumarina: 5 a 200 ng mL⁻¹; ácido α -cumárico: 75 a 400 ng mL⁻¹; ácido caurenóico: 25 a 200 ng mL⁻¹; siringaldeído: 75 a 400 ng mL⁻¹; dihidrocumarina: 50 a 200 ng mL⁻¹. Conforme descrito no ensaio de linearidade (item 4.1.7.3.1), dentro dos limites inferiores e superiores de concentração estabelecidos para cada composto, os métodos apresentaram precisão, exatidão e linearidade adequados (Tabelas 31 e 32).

4.2.2.4 Precisão

4.2.2.4.1 Repetibilidade

A repetibilidade foi realizada em um período curto de tempo pelo mesmo analista e em três níveis de concentração contemplando os limites inferior, médio e superior de quantificação de cada composto. Neste ensaio os padrões internos

também foram avaliados nas concentrações de uso, uma vez que todo o doseamento é dependente de uma boa resposta destes compostos.

Os valores de CV obtidos no ensaio de repetibilidade são apresentados na Tabela 33, onde pode ser verificada uma boa resposta dos compostos (CV < 10%) dentre os diferentes níveis de concentração avaliados.

TABELA 33 – COEFICIENTES DE VARIAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DAS ÁREAS NO ENSAIO DE REPETIBILIDADE ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM.

Analitos	Concent. (ng mL⁻¹)	Período 1 Áreas ± DP	Período 2 Áreas ± DP	Média ± DP	CV (%)
Cumarina	5,0	7846,6 ± 190,0	8066,6 ± 200,4	7966,6 ± 141,4	1,78
	50,0	92133 ± 1159,0	87466,7 ± 1201,4	89800 ± 3299,8	3,67
	100,0	371000 ± 6557,4	380333 ± 14571,7	375667 ± 6599,6	1,76
Dihidro cumarina	50	18973,4 ± 716,2	20246,6 ± 621,8	19630 ± 928,86	4,73
	100	128000 ± 4358,9	133667 ± 2081,6	130833 ± 4006,9	3,06
	200	167000 ± 3464,1	166667 ± 2516,6	166833 ± 235,7	0,14
Ácido o-cumárico	75	17766,7 ± 404,1	16766,7 ± 808,29	17266,7 ± 707,1	4,09
	200	57967 ± 1124,0	61600,0 ± 953,9	59783 ± 2569,2	4,30
	400	108333 ± 2081,6	108666,7 ± 1527,5	108500 ± 235,7	0,22
Ácido caurenóico	25	183667 ± 4163,3	178666,7 ± 8082,9	181167 ± 3535,5	1,95
	100	546333 ± 25501,6	565667 ± 5507,6	556000 ± 13671	2,46
	200	1536667 ± 25166	1546667 ± 15275	1541667 ± 7071	0,46
Siringaldeído	75	26500 ± 435,9	24900 ± 781,0	25700 ± 1131,4	4,40
	200	90766,7 ± 1850,2	99200 ± 4015,0	94983 ± 5963,3	6,27
	400	158000 ± 4041,5	162333,3 ± 6658,3	160167 ± 3064,1	1,91
6-metil cumarina	40	4323,3 ± 30,5	4490 ± 158,7	4406,7 ± 117,9	2,67
Prednisona	1000	275666,7 ± 2081,6	278333 ± 14189,2	277000 ± 1885,6	0,68

NOTA: n=3.

4.2.2.4.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi realizada nos mesmos níveis de concentração do ensaio de repetibilidade, no entanto em dias diferentes, com analista diferente. Após as injeções em CLAE-EM/EM as variações das réplicas em cada nível de concentração foram menores que 10%, conforme demonstrado na Tabela 34.

Em virtude das baixas variações obtidas nos dois níveis de avaliação do parâmetro de precisão, os métodos desenvolvidos foram considerados precisos.

TABELA 34 - COEFICIENTES DE VARIAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DAS ÁREAS NO ENSAIO DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (n=3).

Analitos	Concentr. (ng mL ⁻¹)	Analista 1 Áreas ± DP	Analista 2 Áreas ± DP	Média ± DP	CV (%)
	5,0	7846,6 ± 190,0	8160,0 ± 150,98	8133,4 ± 66,0	2,59
Cumarina	50,0	92133,3 ± 1159,0	90900,0 ± 1802,8	89183,3 ± 2427,7	0,95
	100,0	371000 ± 6557,4	396333 ± 15143,8	3836,7 ± 17913,4	4,67
Dihidro cumarina	50	18973,4 ± 716,2	20200,0 ± 400,0	19586,6 ± 867,4	4,42
	100	128000 ± 4358,9	133333,3 ± 1527,5	130666,7 ± 3771,2	2,88
	200	167000,0 ± 3464,1	163333,3 ± 3214,6	166666,7 ± 471,4	0,28
Ácido o-cumárico	75	10500,0 ± 264,6	10766,7 ± 208,2	10633,3 ± 188,6	1,77
	200	29133,3 ± 838,64	27200,0 ± 360,6	28166,7 ± 1367,1	4,85
	400	62166,7 ± 611,0	59300 ± 2264,9	60733,3 ± 2027,0	3,34
Ácido caurenóico	25	10500,0 ± 173,2	11133,3 ± 230,9	10816,7 ± 447,8	4,14
	100	37200,0 ± 608,3	37666,7 ± 929,2	37433,3 ± 330,0	0,88
	200	77366,7 ± 450,9	75133,3 ± 1115,0	76250,0 ± 1579,2	2,07
Siringaldeído	75	1833,3 ± 60,3	1840,0 ± 36,1	1836,7 ± 4,8	0,26
	200	5013,3 ± 83,9	4696,7 ± 169,2	4855,0 ± 223,9	4,61
	400	10060,0 ± 163,7	9833,3 ± 162,6	9946,7 ± 160,28	1,61
Prednisona	1000	275666,7 ± 2081,6	274666,7 ± 5131,6	275166,7 ± 707,1	0,26
6-metil cumarina	40	4323,3 ± 30,5	4480 ± 131,2	4401,7 ± 110,8	2,92

4.2.2.5 Exatidão

O parâmetro de exatidão foi avaliado pelo método da adição do padrão, dado em porcentagem.

Para realização deste ensaio, inicialmente foi necessário conhecer as áreas dos metabólitos presentes na matriz de trabalho. Para tanto, uma amostra de escolha foi diluída e injetada em CLAE-EM/EM nos diferentes modos de ionização, sendo as áreas obtidas de cada metabólito registradas. Em seguida essa mesma amostra foi fortificada com os padrões dos metabólitos de interesse em três níveis de concentração de cada composto. O mesmo procedimento foi realizado com os padrões internos, no entanto em um único nível de concentração.

As áreas de cada analito presentes na amostra sem fortificação foram por fim subtraídas daquelas obtidas na amostra fortificada, sendo o valor encontrado considerado como experimental. A exatidão do método foi determinada comparando as áreas experimentais com as nominais, adquiridas após injeções dos padrões analíticos, nos mesmos níveis de concentração da fortificação.

Ao término dos experimentos, os valores recuperados variaram entre 97,7 a 103,6% para cumarina; 95,3 a 103,8% para o ácido o-cumárico; 98,3 a 104,1% para o ácido caurenóico; 95,5 a 96,9% para o siringaldeído e 98,3 a 102,9% para dihidrocumarina. Para os padrões internos a recuperação foi de 101,3% para a 6-metilcumarina e 97,3% para a prednisona (Tabela 35). Estes valores encontram-se inseridos dentro da faixa estipulada de 90 a 110% de recuperação, cumprindo, portanto com os critérios de aceitação do ensaio.

A confiabilidade dos resultados também foi verificada quando da aplicação do intervalo de confiança. Conforme demonstrado na Tabela 35, todas as áreas recuperadas, exceto a do ácido caurenóico no nível mais alto de concentração, foram inseridas dentro de um intervalo de confiança estimado. Ao ácido caurenóico, embora a área recuperada seja pouco menor que o limite inferior de confiança estimado, não se pode afirmar que nesta concentração o método não é exato, pois o erro está contido dentro do desvio padrão obtido neste nível concentração. Portanto os métodos desenvolvidos foram considerados exatos.

TABELA 35 – RESULTADOS DO ENSAIO DE EXATIDÃO EM CLAE-EM/EM UTILIZANDO O MÉTODO DA ADIÇÃO DO PADRÃO.

Analitos	Concentr. (ng mL ⁻¹)	Área teórica (média ± DP)	Intervalo de confiança*	Amostra (Área ± DP)	Amostra fortificada (Área ± DP)	Área recuperada (média)	% Recuperada
Cumarina	5,0	7846,6 ± 190,0	3740,3 – 4106,4	95966,7 ± 1792,6	99800,0 ± 1276,7	3833,3	97,70
	50	93133,7 ± 802,1	92380,5 - 93886,2		189333,3 ± 2081,7	93366,7	101,70
	200	380333 ± 14571,6	366656 - 394010,8		489666,7 ± 13012,8	393699,9	103,60
Ácido o-cumárico	75	17266,7 ± 791,6	16435,9 – 18097,4	6201,7 ± 432,9	22650 ± 273,9	16448,3	95,26
	200	61000 ± 1430,6	58723,6 – 63276,4		69520 ± 705,0	63318,3	103,80
	400	108500 ± 1643,2	106775,6 – 110224,4		116333,3 ± 2338,1	110131,7	101,50
Ácido caurenóico	25	180500 ± 7816,6	172297,0 – 188702,9	138166,7 ± 9108,6	326000 ± 7071,1	187833,3	104,06
	100	556000 ± 19606,1	535424,8 – 576575,2		699666,7 ± 8962,9	561500,0	100,98
	200	1541667 ± 19407,9	1521300 - 1562000		1653333 ± 37859,4	1515167,0	98,28
Siringaldeído	75	25225 ± 910,6	23776,1 – 26673,9	Ausente na amostra	24100 ± 469,04	24100	95,54%
	200	94983,3 ± 5399,4	89317,0 – 100649,6		92033,3 ± 6528,6	92033,3	96,89%
	400	169333,3 ± 9114,1	159768,8 – 178897,9		162000 ± 2915,5	162000	95,67%
Dihidro cumarina	50	18973,4 ± 716,2	9150,5 ± 9822,8	Ausente na amostra	9626,7 ± 410,0	9626,7	101,47
	100	128000 ± 4358,9	123908,6 ± 132091,4		131666,7 ± 3511,9	131666,7	102,86
	200	163666,7 ± 5033,2	158942,1 ± 168391,0		160833,3 ± 1755,9	160833,3	98,27%
6-metil cumarina	40	4323,3 ± 83,9	4115,0 – 4531,7	Ausente na amostra	4380 ± 60,0	4380	101,32
Prednisona	1000	284333,3 ± 11147,5	272634,8 – 296031,8	Ausente na amostra	276666,7 ± 5988,9	276666,7	97,30

NOTA: *Intervalo de confiança no nível de 95%; n=6.

4.2.2.6 Estabilidade

A estabilidade das soluções dos padrões dos metabólitos em estudo foi avaliada em três níveis de concentração. Em virtude da importância dos padrões internos para a determinação dos metabólitos de interesse, estes também foram avaliados, porém em um único nível de concentração.

Para a determinação da estabilidade, soluções preparadas a fresco foram injetadas em sextuplicata em CLAE-EM/EM sendo as áreas obtidas comparadas com aquelas adquiridas após um período de armazenamento de 12 horas em temperatura controlada (20–23 °C), 24 horas no injetor automático, e 30 dias sob refrigeração a 4 °C.

Conforme apresentado na Tabela 36, durante o período normal de preparo e análise das amostras (12 - 24 horas) a estabilidade dos compostos foi satisfatória com variações de área e recuperação menores que 10%.

Apenas após 30 dias de armazenamento foi observado um comprometimento maior na recuperação dos compostos (88,37 a 111,62%). No entanto, estes valores não comprometem de forma significativa a estabilidade destes analitos, uma vez que os valores de aceitação (90 - 110%) estão inseridos dentro dos desvios obtidos em cada nível de concentração onde o erro maior foi determinado. Além disso, as variações entre as áreas nominais e experimentais foram menores que 8,4 %, resultados estes que asseguram uma boa estabilidade das soluções mesmo após um longo período de armazenamento. Portanto, os analitos em estudo mantiveram-se inalterados nas condições especificadas e podem ser utilizados com segurança dentro do período normal de análise e armazenamento das soluções.

TABELA 36 – RESULTADO DO ENSAIO DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE TRABALHO.

Compostos	Níveis de Concentração (ng mL ⁻¹)	12 horas de armazenamento		24 horas de armazenamento		30 dias de armazenamento	
		^a Recuperação % ± DP	^b CV%	^a Recuperação% ± DP	^b CV%	^a Recuperação % ± DP	^b CV%
Cumarina	5,0	107,09 ± 5,20	4,84	106,6 ± 5,44	4,51	92,05 ± 2,07	5,85
	50,0	99,52 ± 2,31	0,34	108,48 ± 5,26	5,76	111,62 ± 4,16	7,77
	100,0	100,27 ± 1,76	0,19	100,48 ± 4,15	0,34	94,05 ± 4,66	4,34
Ácido o-cumárico	75	106,47 ± 3,45	4,43	108,76 ± 1,62	5,94	89,29 ± 3,19	8,00
	200	103,65 ± 3,66	2,54	105,32 ± 1,77	3,67	92,33 ± 8,52	5,64
	400	107,37 ± 1,86	5,03	100,77 ± 3,50	0,54	88,75 ± 3,19	8,43
Ácido caurenóico	25	103,23 ± 4,18	2,25	92,43 ± 1,49	5,56	99,24 ± 9,26	1,09
	100	95,96 ± 2,26	3,65	90,35 ± 2,83	7,17	93,79 ± 5,59	4,53
	200	98,81 ± 3,38	0,85	91,03 ± 3,62	6,64	108,64 ± 6,04	5,86
Siringaldeído	75	104,67 ± 3,27	3,23	104,54 ± 3,67	3,14	91,34 ± 5,40	6,40
	200	100,35 ± 2,29	0,25	98,79 ± 1,70	0,86	88,37 ± 4,17	8,73
	400	101,57 ± 3,25	1,10	97,05 ± 2,45	2,12	89,91 ± 4,66	7,51
Dihidrocumarina	50	97,72 ± 3,81	1,63	95,19 ± 4,46	3,49	96,15 ± 6,74	2,78
	100	98,10 ± 2,67	1,36	97,42 ± 2,00	1,85	97,57 ± 2,62	1,74
	200	98,54 ± 2,52	1,04	96,71 ± 1,93	2,37	89,44 ± 3,13	3,95
6-metilcumarina	40	100,38 ± 1,97	0,27	100,23 ± 3,53	0,16	100,10 ± 5,64	0,07
Prednisona	1000	99,88 ± 2,61	0,08	97,07 ± 1,80	2,10	89,49 ± 4,30	7,84

NOTA: n=6; ^a Expressa sobre a concentração nominal; ^b Variação entre as áreas nominais as áreas experimentais.

4.2.3 Determinação via CLAE-EM/EM dos metabólitos secundários do guaco nas amostras de xarope e solução oral

Ao término da validação dos métodos, os metabólitos cumarina, ácido *o*-cumárico, ácido caurenóico, siringaldeído e dihidrocumarina foram quantificados nas especialidades farmacêuticas. Os teores médios obtidos destes metabólitos são apresentados na tabela abaixo:

TABELA 37 – TEOR DOS METABÓLITOS EM ESTUDO OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM NAS ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS XAROPE E SOLUÇÃO ORAL DE GUACO.

Amostras	Metabólitos ($\mu\text{g mL}^{-1} \pm \text{DP}$)				
	Cumarina	Ácido <i>o</i> -cumárico	Ácido Caurenóico	Dihidro cumarina	Siringaldeído
1	279,49 \pm 5,19	16,64 \pm 0,14	15,82 \pm 0,27	-	-
2	32,65 \pm 0,93	3,42 \pm 0,07	8,14 \pm 0,13	-	-
3	26,83 \pm 0,69	7,53 \pm 0,14	3,10 \pm 0,07	-	-
4	53,05 \pm 1,69	9,15 \pm 0,33	18,05 \pm 0,33	-	-
5	159,38 \pm 6,70	22,09 \pm 1,09	33,49 \pm 0,74	-	-
6	158,64 \pm 1,71	19,54 \pm 0,39	129,66 \pm 10,35	-	-
7	35,97 \pm 1,36	6,14 \pm 0,12	7,44 \pm 0,09	-	-
8	36,13 \pm 0,43	Traços	-	-	-
9	2,31 \pm 0,06	Traços	-	-	-
10	26,37 \pm 0,52	4,40 \pm 0,11	2,46 \pm 0,05	-	-
11	2,44 \pm 0,08	Traços	0,53 \pm 0,05	-	-
12	37,28 \pm 0,47	13,46 \pm 0,27	-	-	-

NOTA: - Não detectado.

Conforme verificado na Tabela 37, apenas a cumarina, o ácido *o*-cumárico e o ácido caurenóico foram detectados nas 12 amostras analisadas. Esses resultados reforçam a importância destes metabólitos com as propriedades terapêuticas desses

fitoterápicos, uma vez que estes foram detectados em grande quantidade nestas amostras.

Apesar da literatura mencionar a dihidrocoumarina e o siringaldeído como majoritários nos extratos medicinais do guaco, estes não foram detectados nas amostras mesmo após a utilização de um método de maior sensibilidade de detecção (LD de 2,5 e 5,0 ng mL⁻¹, respectivamente). Em relação à cumarina, os teores obtidos em CLAE-EM/EM confirmam as discrepâncias no conteúdo deste metabólito entre as amostras de especialidades farmacêuticas, justificando mais uma vez a necessidade de um controle de qualidade mais rigoroso.

Após o doseamento, os resultados obtidos entre os dois métodos foram por fim comparados.

4.3 COMPARATIVO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS EM CLAE-DAD E CLAE-EM/EM

As variações entre os resultados obtidos com CLAE-DAD e os obtidos com CLAE-EM/EM foram avaliadas através do coeficiente de variação (CV%). Nesse comparativo apenas os teores de cumarina e ácido *o*-cumárico foram avaliados, uma vez que estes são os únicos metabólitos presentes entre os métodos desenvolvidos.

Os resultados são apresentados na Tabela 38, onde é possível verificar uma dispersão menor que 5% entre os teores obtidos com as diferentes técnicas analíticas. Portanto os resultados não diferiram entre si.

Importante enfatizar que devido ao fato da utilização de diferentes sistemas de detecção e de diferentes sensibilidades entre os equipamentos, o comparativo entre os métodos não foi possível de ser realizado. O CLAE-EM/EM possui uma sensibilidade 1000 vezes maior que CLAE-DAD e por consequência disso, uma maior tolerância quanto às variações de precisão e exatidão.

TABELA 38 – COMPARATIVO ENTRE OS RESULTADOS DE TEOR DE CUMARINA E ÁCIDO O-CUMÁRICO OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-DAD E CLAE-EM/EM.

Amostras	Metabólitos ($\mu\text{g mL}^{-1} \pm \text{DP}$)					
	Cumarina			Ác. o-cumárico		
	CLAE-DAD	CLAE-EM/EM (Modo positivo de ionização)	CV%	CLAE-DAD	CLAE-EM/EM (Modo negativo de ionização)	CV%
1	280,89 \pm 1,78	279,49 \pm 5,19	0,18	16,89 \pm 0,23	16,64 \pm 0,14	0,53
2	35,97 \pm 1,62	32,65 \pm 0,93	3,42	3,45 \pm 0,11	3,42 \pm 0,07	0,31
3	28,31 \pm 0,95	26,83 \pm 0,69	1,90	7,84 \pm 0,11	7,53 \pm 0,14	1,43
4	55,35 \pm 1,79	53,05 \pm 1,69	1,50	9,56 \pm 0,03	9,15 \pm 0,33	1,54
5	169,40 \pm 0,48	159,38 \pm 6,70	2,16	23,73 \pm 0,66	22,09 \pm 1,09	2,53
6	154,61 \pm 1,17	158,64 \pm 1,71	0,91	19,64 \pm 0,44	19,54 \pm 0,39	0,17
7	33,91 \pm 0,23	35,97 \pm 1,36	2,08	5,79 \pm 0,24	6,14 \pm 0,12	2,05
8	33,04 \pm 1,71	36,13 \pm 0,43	3,16	Traços	Traços	-
9	2,42 \pm 0,03	2,31 \pm 0,06	1,64	Traços	Traços	-
10	23,21 \pm 0,19	26,37 \pm 0,52	4,51	4,79 \pm 0,22	4,40 \pm 0,11	3,00
11	2,30 \pm 0,09	2,44 \pm 0,08	2,09	Traços	Traços	-
12	33,42 \pm 1,09	37,28 \pm 0,47	3,86	13,92 \pm 0,05	13,46 \pm 0,27	1,20

NOTA: Intervalo de aceitação 90 – 110%;

4.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS MÉTODOS DESENVOLVIDOS

As principais diferenças entre os métodos propostos e os disponíveis na literatura são a ausência da etapa de extração e a possibilidade de monitoramento de vários metabólitos relacionados ao efeito terapêutico do guaco. Para fins comparativos, uma breve descrição e consideração sobre as diferentes técnicas encontradas na literatura foram realizadas.

O método descrito por Bueno e Bastos (2009) emprega como técnica analítica cromatografia gasosa. Neste método a extração da cumarina no xarope de guaco é realizado através da agitação constante de 10 g da especialidade farmacêutica em 20 mL de acetato de etila a 40 °C durante 30 min, acarretando portanto num tempo dispendioso entre extração e resfriamento da amostra além de um alto consumo de solvente extrator.

O método proposto por Silva e colaboradores (2008) utiliza espectroscopia de ultravioleta para detecção da cumarina. Neste método cada alíquota de 10 mL da amostra a ser analisada é submetida à extração utilizando um total de 50 mL de clorofórmio. Além disso, o tempo mínimo necessário para cada extração é de 30 minutos, o que torna a análise prolongada, gerando ainda grandes quantidades de resíduos poluentes.

O método proposto por Rocha e colaboradores (2008) utiliza 25 mL de diclorometano como solvente extrator para cada análise realizada. Este método utiliza cromatografia líquida de alta eficiência para monitoramento da cumarina empregando uma fase móvel composta de acetonitrila/água (30:70, v/v) em um fluxo de 1,0 mL min⁻¹ durante 20 minutos. Apesar do moderado consumo da fase móvel, a consideração a ser feita sobre este método é que além de exigir algumas etapas de extração, monitora apenas a cumarina, não dando o devido apreço a esta técnica, capaz de monitorar vários compostos com seletividade adequada.

Em analogia aos três métodos descritos na literatura, as indústrias farmacêuticas de fitoterápicos as quais produzem uma série de lotes de medicamentos a base de guaco todos os dias desprenderiam de muito tempo utilizando etapas de extração. Isso torna as análises mais onerosas, pois além do excessivo consumo destes solventes, existe também o gasto com recursos

humanos, uma vez que o tempo utilizado na etapa de pré-tratamento dessas amostras é grande.

Em se tratando de custo das análises, com clareza é possível afirmar que análises através de um espectrofotômetro de ultravioleta são bem mais econômicas do que as análises realizadas por CG, CLAE e principalmente através de espectrometria de massas. No entanto, o uso de um espectrofotômetro de ultravioleta é limitado, principalmente no que diz respeito ao monitoramento de outros marcadores com determinada seletividade, o que torna as técnicas de CG, CLAE-DAD e CLAE-EM/EM mais interessantes e utilizadas.

Contudo, os métodos desenvolvidos de CLAE-DAD e CLAE-EM/EM demonstraram-se adequados para seu propósito, monitorando com grande sensibilidade e seletividade não somente a cumarina, mas também o ácido *o*-cumárico, o siringaldeído, o ácido caurenóico e a dihidrocuamrina, metabólitos estes considerados como majoritários e diretamente relacionados aos efeitos terapêuticos do guaco. Além de tudo, estes métodos não utilizaram etapas de pré-tratamento das amostras, o que tornou as análises muito mais rápidas e ecologicamente interessantes. Portanto estes métodos podem ser utilizados para o controle de qualidade das especialidades farmacêuticas xarope e solução oral de guaco em rotinas de quantificação da indústria farmacêutica de fitoterápicos.

5 Conclusão

A completa revisão bibliográfica das espécies de *Mikania* estudadas vislumbrou a grandiosidade de informações disponíveis na literatura de forma disseminada, o que justificou sua realização. Nesse sentido um estudo mais minucioso, com informações compiladas e sistematizadas veio a corroborar de uma forma mais simplificada com futuras pesquisas, pois com uma visão geral dos avanços realizados, novas idéias podem ser traçadas.

O método desenvolvido através de CLAE-DAD provou ser adequado para a determinação da cumarina, do ácido o-cumárico, da dihidrocumarina e do siringaldeído nos extratos e nas especialidades farmacêuticas a base de guaco. Além disso, demonstrou seletividade, linearidade, precisão e exatidão aceitáveis de acordo com legislação nacional e internacional vigente. O estudo de robustez indicou que pequenas alterações na composição da fase móvel e na temperatura não influenciam de forma significativa no desempenho do método, no entanto, alterações na vazão de fluxo não devem ser realizadas, pois este parâmetro demonstrou-se crítico.

Os métodos desenvolvidos através de CLAE-EM/EM demonstraram seletividade e grande sensibilidade na detecção da cumarina, do ácido o-cumárico, da dihidrocumarina, do siringaldeído e do ácido caurenóico nas especialidades farmacêuticas xarope e solução oral de guaco. Dentro dos critérios estabelecidos para equipamentos de alta sensibilidade, os métodos apresentaram linearidade, precisão e exatidão.

Os analitos em estudo apresentaram boa estabilidade em solução quando avaliados 12 horas em temperatura ambiente, 24 horas no injetor automático e 30 dias sob refrigeração. Esses resultados garantem confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados uma vez que nas condições de manuseio, análise e armazenamento das amostras os compostos permaneceram inalterados.

Quando comparados os teores de cumarina e ácido o-cumárico entre CLAE-DAD e CLAE-EM/EM (modo positivo e negativo de ionização) foi observado que os resultados não diferiram entre si (CV <5%). Ademais não foi possível avaliar a

equivalência de precisão e exatidão entre os métodos em virtude de se tratar de técnicas diferentes com sensibilidades diferentes.

Independentemente do método utilizado, quando doseadas as especialidades farmacêuticas foi verificado valores discrepantes no conteúdo dos metabólitos, principalmente da cumarina (2,3 a 280 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Estes resultados devem refletir na eficácia esperada destes fitoterápicos e indicam a necessidade de padronização, além de um melhor controle de qualidade nestes produtos.

Diferentes teores de ácido o-cumárico (traços a 22,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e ácido caurenóico (0,5 a 130 $\mu\text{g mL}^{-1}$) também foram encontrados nas amostras analisadas. Em virtude da grande quantidade obtida na maioria das amostras e das atribuições farmacológicas relacionadas a estes metabólitos, provavelmente estes, juntamente com a cumarina são os grandes responsáveis pelos efeitos benéficos do guaco. Os demais metabólitos, siringaldeído e dihidrocumarina não foram detectados nas amostras, apesar de serem descritos como majoritários nos extratos medicinais de guaco.

Os métodos desenvolvidos podem ser aplicados com segurança nas especialidades farmacêuticas xarope e solução oral de guaco, sendo, portanto alternativas para análise de controle de qualidade da indústria farmacêutica.

6 Referências Bibliográficas

ABOY, A. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; LANGELOH, A.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas de *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae), guaco. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 36, n. 1, p.165-172, 2000.

ABOY, A. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; LANGELOH, A.; BASSANI, V. L. Atividade antiespasmódica de soluções extrativas de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 3, p.185-191, 2002.

ANDRADE, E. C. B.; ALVES, S. P.; TAKASE, I. Extração sequencial de cobre, ferro e zinco em ervas medicinais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p.844-848, 2005.

BARROS, C. B. Validação de Métodos Analíticos. **Biológico**, v. 64, n. 2, p.175-177, 2002.

BERTOLUCCI, S. K.; PEREIRA, A. B.; PINTO, J. E.; DE AQUINO RIBEIRO, J. A.; DE OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. Development and Validation of an RP-HPLC Method for Quantification of Cinnamic Acid Derivatives and Kaurane-Type Diterpenes in *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. **Planta Medica**, v. 75, n. 3, p.280-285, 2008.

BIAVATTI, M. W.; KOERICH, C. A.; HENCK, C. H.; ZUCATELLI, E.; MARTINELLI, F. H.; BRESOLIN, T. B.; LEITE, S. N. Coumarin content and physicochemical profile of *Mikania laevigata* extracts. **Z Naturforsch**, v. 59, n. 3, p.197-200, 2004.

BIGHETTI, A. E.; ANTONIO, M. A.; KOHN, L. K.; REHDER, V. L.; FOGLIO, M. A.; POSSENTI, A.; VILELA, L.; CARVALHO, J. E. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. **Phytomedicine**, v. 12, n. 1, p.72-77, 2005.

BIGUETTI, A. E. **Atividade antiulcerogênica do extrato bruto hidroalcoólico e da cumarina isolada da Mikania laevigata Schultz Bip.** . 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

BRASIL. **Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil.** 1ª ed. São Paulo: Nacional, 1929.

BRASIL. ANVISA. Resolução RDC nº 17 de 24 de fevereiro de 2000. Dispõe sobre o registro de fitoterápicos. Ministério da Saúde. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 22 fev. 2000a.

BRASIL. ANVISA. Resolução RDC nº 102 de 30 de novembro de 2000. Aprova o Regulamento sobre propagandas, mensagens publicitárias e promocionais e outras práticas cujo objeto seja a divulgação, promoção ou comercialização de medicamentos de produção nacional ou importados. Ministério da Saúde. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 30 nov. 2000b.

BRASIL. **Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos**. 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

BRASIL. ANVISA. Resolução nº 899 de 29 maio de 2003. Determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 29 mai. 2003a.

BRASIL. ANVISA. Resolução RDC nº 210 de 4 de agosto de 2003. Determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos. Ministério da Saúde. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 4 ago. 2003b.

BRASIL. ANVISA. Resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de fitoterápicos. Ministério da Saúde. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 16 mar. 2004a.

BRASIL. ANVISA. Resolução RE 89 de 16 de março de 2004. Determina a lista de registro simplificado de fitoterápicos no Brasil. **Diário Oficial da União**. Brasília - DF, 16 mar. 2004b.

BRASIL. ANVISA. Resolução - RE nº 88 de 16 de março de 2004. Determina a publicação da lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 16 mar. 2004c.

BRASIL. ANVISA. Resolução - RE nº 90 de 16 de março de 2004. Determina o guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 16 mar. 2004d.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

BRASIL. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Ministério da Saúde. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 3 de mai. 2006a.

BRASIL. ANVISA. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 22 jun. 2006b.

BRASIL. Portaria GM nº 3.237 de 24 de dezembro de 2007. Aprova as normas de execução e de financiamento da assistência farmacêutica na atenção básica em saúde. **Ministério da Saúde**. Brasília-DF, 24 dez. 2007.

BRASIL. ANVISA. Instrução normativa nº 5 de 11 de dezembro de 2008 - Determina a lista de registro simplificado de fitoterápicos no Brasil - Revoga o disposto da Resolução RE no 89 de 16 de março de 2004. **Diário Oficial da União** Brasília - DF, 11 dez. 2008.

BUENO, P. C. P.; BASTOS, J. K. A validated capillary gas chromatography method for guaco (*Mikania glomerata* S.) quality control and rastreability: from plant biomass to phytomedicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1, p. 218-223, 2009.

CABRAL, L. M.; DOS SANTOS, T. C.; ALHAIQUE, F. Development of a profitable procedure for the extraction of 2-H-1-benzopyran-2-one (coumarin) from *Mikania glomerata*. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 27, n. 1, p.103-106, 2001.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC Fundamentos, Estratégia e Validação**. São Carlos: EdUFSCar, 2001.

CATALDI, T. R.; BIANCO, G.; ABATE, S. Profiling of N-acyl-homoserine lactones by liquid chromatography coupled with electrospray ionization and a hybrid quadrupole linear ion-trap and Fourier-transform ion-cyclotron-resonance mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-FTICR-MS). **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, n. 1, p. 82-96, 2008.

CAVALCANTI, B. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BURBANO, R. R.; SILVEIRA, E. R.; CUNHA, K. M.; RAO, V. S.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; HENRIQUES, J. A.; PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 3, p.388-92, 2006.

CELEGHINI, R. M. D. S. E. A. Análise quantitativa de cumarina em amostras comerciais de "guaco" por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Planta Medica**, v. 1, n. 2, p.23-28, 1999.

CELEGHINI, R. M. S.; VILEGAS, J. H. Y.; LANCAS, F. M. Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Spreng. ("guaco") leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 6, p.706-709, 2001.

COLE, R. B. **Electrospray Ionization Mass Espectrometry-fundamentals, Instrumentation & Applications**. New York: John Wiley&Sons, 1997.

CONTINI, S. H. T.; SANTOS, P. A.; VENEZIANI, R. C. S.; PEREIRA, M. A. S.; FRANCA, S. C.; LOPES, N. P.; OLIVEIRA, D. C. R. Differences in secondary metabolites from leaf extracts of *Mikania glomerata* Sprengel obtained by micropropagation and cuttings. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p.596-598, 2006.

COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M.; FARIAS, P. A.; VIANA, G. S.; CUNHA, K. M.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; RAO, V. S. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p.1231-234, 2002.

COTORAS, M.; FOLCH, C.; MENDOZA, L. Characterization of the antifungal activity on *Botrytis cinerea* of the natural diterpenoids kaurenoic acid and 3 β -hydroxy-kaurenoic acid. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 10, p.2821-2826, 2004.

CUNHA, K. M. A.; PAIVA, L. A. F.; SANTOS, F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaífera langsdorffii* on rat uterus *in vivo*. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 4, p.320-324, 2003.

DOOLEY, K. C. Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory. **Clinical Biochemistry**, v. 36, n. 6, p.471-481, 2003.

DUARTE, M. C.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p.305-311, 2005.

FARAH, M. H.; SAMUELSSON, G. Pharmacologically active phenylpropanoids from *Senra incana*. **Planta Medica**, v. 58, n. 1, p.14-8, 1992.

FDA. Reviwer Guidance – Validation of chromatographic methods. Food and Drug Administration. **Center for Drug Evaluation and Research (CDER)**. Rockville, 1994.

FIERRO, I. M.; DA SILVA, A. C.; LOPES CDA, S.; DE MOURA, R. S.; BARJA-FIDALGO, C. Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p.19-24, 1999.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p.178-182, 2005.

GASPARETTO, J. C.; CAMPOS, F.R.; BUDEL, J. M.; PONTAROLO, R. *Mikania glomerata* e *M. laevigata*: Estudos agrônômicos, genéticos, morfoanatômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e uso nos programas de fitoterapia do Brasil - Uma revisão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, artigo aceito em 28 de outubro de 2009.

GHISALBERT, E. L. The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. **Fitoterapia**, v. 68, n. 4, p.303-325, 1997.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p.140-150, 2003.

GRACA, C.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; RATTMANN, Y. D.; DE SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; SASSAKI, G. L.; RIECK, L.; PONTAROLO, R.; DA SILVA-SANTOS, J. E.; MARQUES, M. C. In vivo assessment of safety and mechanisms underlying in vitro relaxation induced by *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker in the rat trachea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p.430-439, 2007.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19-20, p.894-901, 2008.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p.1027-1031, 2002.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003.

HOULT, J. R. S.; PAYA, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology**, v. 27, n. 4, p.713-722, 1996.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Nov. de 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA (INMETRO). Orientações sobre validação de Métodos e Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. mar. de 2003.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). Harmonized guidelines for international quality control in analytical chemistry laboratories. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n. 4, p.649-666, 1995.

JANKE, D. R. Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. Part II. Guidelines for Primary Validation Parameters. **Instrumentation Science & Technology**, v. 26, n. 1, p.1-35, 1998.

KORFMACHER, W. A. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 20, p.1357-67, 2005.

KOSUGE, T.; CONN, E. E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 237, n. 5, p.1653-1656, 1962.

LAKE, B. G.; EVANS, J. G.; LEWIS, D. F. V.; PRICE, R. J. Comparison of the hepatic effects of coumarin, 3,4-dimethylcoumarin, dihydrocoumarin and 6-methylcoumarin in the rat **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, n. 8, p.743-751, 1994.

LAKE, B. G.; GRAY, T. J. B.; EVANS, J. G.; LEWIS, D. F. V.; BEAMAND, J. A.; HUE, K. L. Studies on the mechanism of coumarin-induced toxicity in rat hepatocytes: Comparison with dihydrocoumarin and other coumarin metabolites. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 97, n. 2, p.311-323, 1989.

LEITE, M. G. R.; SOUZA, C. L.; SILVA, M. A. M.; MOREIRA, L. K. A.; MATOS, F. J. A.; VIANA, G. S. B. Estudo farmacológico comparativo de *Mikania glomerata* Spreng (guaco), *Justicia pectoralis* Jacq (anador) e *Torresea cearensis* Fr. All (cumarú). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 74, n. 1, p.12-15, 1993.

LOBITZ, G. O.; TAMAYO-CASTILLO, G.; MERFORT, I. Diterpenes and sesquiterpenes from *Mikania banisteriae*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 1, p.161-164, 1997.

LOBODA, A. V.; KRUTCHINSKY, A. N.; BROMIRSKI, M.; ENS, W.; STANDING, K. G. A tandem quadrupole/time-of-flight mass spectrometer with a matrix-assisted laser desorption/ionization source: design and performance. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 14, n. 12, p.1047-1057, 2000.

LUCAS, V. Estudo farmacognóstico do guaco *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Flora Medicinal**, v. 9, n. 1, p.101-132, 1942.

MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S.; DAHER, M. A.; OLIVEIRA, C. Z.; COUTO, L. B.; GOMES, O. A.; FRANCA, S. C.; SOARES, A. M.; PEREIRA, P. S. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 364-370, 2005.

MAMANI, M. C.; ALEIXO, L. M.; DE ABREU, M. F.; RATH, S. Simultaneous determination of cadmium and lead in medicinal plants by anodic stripping voltammetry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 4, p.709-713, 2005.

MARQUES, L. A. **Aplicação de técnicas avançadas de espectrometria de massas em ciências de alimentos e perfumaria**. 85 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MAURER, H. H. Liquid Chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. **Journal of Chromatography B**, v. 713, n. 1, p.3-25, 1998.

MONGELLI, E.; POMILIO, A. B.; SANCHES, J. B.; GUERRA, F. M.; MASSANET, G. M. ent-Kaur-16-em-19-oic acid, a KB cells cytotoxic diterpenoid from *Elaeoselinum foetidum*. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 4, p.387-388, 2002.

MUCENEEKI, R. S.; AMORIM, C. M.; CESCA, T. G.; BIAVATTI, M. W.; BRESOLIN, T. B. A simple and validated LC method for the simultaneous determination of three compounds in *Mikania laevigata* extracts **Chromatographia**, v. 69, n. 2, p.219-223, 2009.

MURGU, M. **Estudo de Metodologias Analíticas para Quassinóides: espectrometria de massas e cromatografia**. 130 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1998.

NEVES, L. J.; SÁ, M. D. F. A. Contribuição ao estudo de plantas medicinais *Mikania glomerata* Spreng. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 72, n. 2, p.42-47, 1991.

NIESSEN, W. M. State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 856, n. 1-2, p.179-97, 1999.

NIESSEN, W. M. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1-2, p.413-36, 2003.

OLAHARSKI, A. J.; RINE, J.; MARSHALL, B. L.; BABIARZ, J.; ZHANG, L.; VERDIN, E. The flavoring agent dihydrocoumarin reverses epigenetic silencing and inhibits sirtuin deacetylases. **PloS Genetic**, v. 1, n. 6, p.689-694, 2005.

OLIVEIRA, F.; ALVARENGA, M. A.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. Isolamento e identificação de componentes químicos de *Mikania glomerata* Sprengel e de *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 20, n. 2, p.169-183, 1984.

OLIVEIRA, F.; SAITO, M. L.; GARCIA, L. O. Caracterização cromatográfica em camada delgada do extrato fluído de guaco - *Mikania glomerata* Sprengel. **Lecta-USF**, v. 11, n. 1, p.43-55, 1993.

Organização Mundial da Saúde - OMS. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional**. Ginebra, 2002

OSORIO, A. C. Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco por espectrofotometria derivada de primeira ordem. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 4, p.481-486, 2004.

PEDROSO, A. P. D.; SANTOS, S. C.; STEIL, A. A.; DESCHAMPS, F.; BARISON, A.; CAMPOS, F.; BIAVATTI, M. W. Isolation of syringaldehyde from *Mikania laevigata* medicinal extract and its influence on the fatty acid profile of mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p.63-69, 2008.

PEREGRINO, C. A. F.; LEITÃO, S. G. Chromatographical profiles of fluid extracts and tinctures obtained from *Mikania glomerata* Sprengel sterilized by gamma ray irradiation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p.237-242, 2005.

POLESELLO, S. How to present an analytical method. **Food Chemistry**, v. 58, n. 1, p.145-147, 1996.

QUEENIE, S.; CHUI, H.; ZUCCHINI, R. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: Determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 374-380, 2001.

RADUNZ, L. L. **Efeito da temperatura do ar de secagem no teor e na composição dos óleos essenciais de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e hortelã-comum (*Mentha x villosa* Huds).** 90 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

RASKIN, I.; RIBNICKY, D. M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D. A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J. M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends Biotechnol**, v. 20, n. 12, p.522-31, 2002.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

REHDER, V. L.; SARTORATTO, A.; RODRIGUES, M. V. N. Essencial oils composition from leaves, inflorescences and seeds of *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker and *Mikania glomerata* Sprengel. **Planta Medica**, v. 8, n. 1, p.116-118, 2006.

REZENDE, M. C.; URZUA, A.; BORTOLUZZI, A. J.; VASQUEZ, L. Variation of the antimicrobial activity of *Pseudognaphalium vira vira* (Asteraceae): isolation and X-ray structure of ent-3beta-hydroxy-16-kauren-19-oic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 3, p.459-64, 2000.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

RISHTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: Past successes and present day issues. **American Journal of Cardiology**, v. 101, n. 10A, p.43-49, 2008.

ROCA, M. F.; SOBRINHO, J. L. S.; NUNES, L. C. C.; NETO, P. J. R. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 4, p.177-180, 2007.

ROCHA, L.; LUCIO, E. M. A.; FRANÇA, H. S.; SHARAPIN, N. *Mikania glomerata* Spreng: Desenvolvimento de um produto fitoterápico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p.744-747, 2008.

SANTOS, P. A.; PEREIRA, M. A. S.; FRANÇA, S. C.; LOPES, N. P. Esteróides e cumarina em calos de *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 35, n. 2, p.231 - 235, 1999.

SANTOS, M. F. P.; TAMANQUEIRA, J. B.; MAGALHÃES, J. C. D.; OLIVEIRA, E.C.; VAITSMAN, D. S. Validação da ampliação da faixa de aplicação e do sistema único de injeção para a determinação de nitrogênio total em petróleo e derivados por quimiluminescência. **Boletim técnico da Petrobrás**. v. 46, n. 3/4, p. 411-419, 2003.

SANTOS, S. C. **Caracterização cromatográfica de extratos medicinais de guaco: *Mikania laevigata* SCHULTZ Bip. EX BAKER e *Mikania glomerata* SPRENGEL e ação de *M. laevigata* na inflamação alérgica pulmonar.** 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

SANTOS, S. C.; KRUEGER, C. L.; STEIL, A. A.; KRUEGER, M. R.; BIAVATTI, M. W.; WISNEWSKI JUNIOR, A. LC characterisation of guaco medicinal extracts, *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*, and their effects on allergic pneumonitis. **Planta Medica**, v. 72, n. 8, p.679-684, 2006.

SCHENKEL, E. P.; RÜCHER, G.; MANNS, D.; FALKENBERG, M. B.; MATZENBACHER, N. I.; SOBRAL, M.; MENTZ, L. A.; L., B. S. A.; HEINZMANN, B. M. Screening of Brazilian plants for the presence of peroxides. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, p.191-196, 2002.

SCHMIDT, B.; RIBNICKY, D. M.; POULEV, A.; LOGENDRA, S.; CEFALU, W. T.; RASKIN, I. A natural history of botanical therapeutics. **Metabolism**, v. 57, n. 7, p.3-9, 2008.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia Racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. 4 ed. São Paulo: Manoele, 2002.

SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PRÁTICAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES EM SAÚDE. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008

SILVA, C. R.; GOMES, V. S.; KULKAMP, I. C.; KANIS, L. A. Método espectroscópico para determinação de cumarina em xarope de *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p.594-599, 2008.

SILVA, R. Z.; RIOS, E. M.; SILVA, M. Z.; LEAL, L. F.; YUNES, R. A.; MIGUEL, O. G.; CECHINEL-FILHO, V. Investigação fitoquímica e avaliação da atividade antibacteriana da *Mikania lanuginosa*. **Visão acadêmica**, v. 3, n. 2, p.59-64, 2002.

SIUZDAK, G. **Mass spectrometry for biotechnology**. San Diego: Academic Press, 1996.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Analytical Chemistry**. 7 ed. Orlando: Saunders College Publishing, 1999.

SMYTH, W. F. Recent studies on the electrospray ionisation mass spectrometric behaviour of selected nitrogen-containing drug molecules and its application to drug analysis using liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 824, n. 1, p.1-20, 2005.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2 ed. Danvers: John Wiley & Sons, INC, 1997.

SOARES DE MOURA, R.; COSTA, S. S.; JANSEN, J. M.; SILVA, C. A.; LOPES, C. S.; BERNARDO-FILHO, M.; NASCIMENTO DA SILVA, V.; CRIDDLE, D. N.; PORTELA, B. N.; RUBENICH, L. M.; ARAUJO, R. G.; CARVALHO, L. C. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, n. 2, p.249-56, 2002.

STANIKUNAITE, R.; KHAN, S. I.; TRAPPE, J. M.; ROSS, S. A. Cyclooxygenase-2 inhibitory and antioxidant compounds from the truffle *Elaphomyces granulatus*. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 4, p.575-578, 2009.

STÖCKIGT, J.; SHELUDKO, Y.; UNGER, M.; GERASIMENKO, I.; WARZECHA, H.; STÖCKIGT, D. High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic-electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloids groups. **Journal of Chromatography A**, v. 967, n. 1, p.85- 113, 2002.

SUYENAGA, E. S.; RECHE, E.; FARIAS, F. M.; SCHAPOVAL, E. E.; CHAVES, C. G.; HENRIQUES, A. T. Antiinflammatory investigation of some species of *Mikania*. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 6, p.519-523, 2002.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis - (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p.835-855, 2002.

TIRAPELLI, C. R.; AMBROSIO, S. R.; DA COSTA, F. B.; COUTINHO, S. T.; DE OLIVEIRA, D. C.; DE OLIVEIRA, A. M. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 492, n. 2, p.233-241, 2004.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDINS, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p.616-623, 2002.

USP. **The United States Pharmacopeia**. 31 ed - NF 26. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008.

VAN BRAMER, S. E. **An introduction to mass spectrometry**. Chester: Widener University, 1997.

VAN DEN WORM, E.; BEUKELMAN, C. J.; VAN DEN BERG, A. J.; KROES, B. H.; LABADIE, R. P.; VAN DIJK, H. Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. **European Journal of Pharmacology**, v. 433, n. 2, p.225-230, 2001.

VENEZIANI, R. C. S.; CAMILO, D.; OLIVEIRA, R. Constituents of *Mikania glomerata* Sprengel. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, n. 1, p.99-102, 1999.

VESSMAN, J. Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, n. 8-10, p.867-869, 1996.

VIEIRA, S. H.; TAKAHASHI, J. A.; OLIVEIRA, A. B.; CHIARI, E.; BOAVENTURA, M. A. Novel derivatives of kaurenoic acid: Preparation and evaluation of their Trypanocidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 2, p.151-157, 2002.

VILEGAS, J. H. Y.; DEMARCHI, E.; LANCAS, F. M. Determination of coumarin and kaurenoic acid in *Mikania glomerata* ('guaco') leaves by capillary gas chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 8, n. 2, p.74-77, 1997a.

VILEGAS, J. H. Y.; MARCHI, E.; LANÇAS, F. M. Extraction of low-polarity compounds (with emphasis on coumarin and kaurenoic acid) from *Mikania glomerata* ("guaco") leaves. **Phytochemical Analysis**, v. 8, n. 5, p.266-270, 1997b.

WATSON, J. T. **Introduction Mass Spectrometry**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott - Raven, 1997.

WILKENS, M.; ALARCON, C.; URZUA, A.; MENDOZA, L. Characterization of the bactericidal activity of the natural diterpene Kaurenoic acid. **Planta Medica**, v. 68, n. 5, p.452-454, 2002.

YATSUDA, R.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; MURATA, R. M.; REHDER, V. L.; MELO, L. V.; KOO, H. Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p.183-189, 2005.

ZHIGALTSEV, I. V.; MAURER, N.; AKHONG, Q. F.; LEONE, R.; LENG, E.; WANG, J.; SEMPLE, S. C.; CULLIS, P. R. Liposome-encapsulated vincristine, vinblastine and vinorelbine: a comparative study of drug loading and retention. **Journal of Controlled Release**, v. 104, n. 1, p.103-11, 2005.

ANEXO 1

Curitiba, 24 February 2010.

Dear **Roberto Pontarolo**,

We have evaluated your manuscript FG 794 (*Mikania glomerata* e *M. laevigata*: **estudos agronômicos, genéticos, morfoanatômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e uso nos programas de fitoterapia do Brasil - uma revisão**) and I would like to compliment you: your work is outstanding and it has been accepted for publication in Brazilian Journal of Pharmacognosy. It was accepted on 28 October 2009.

Your contribution has now been assigned to the Technical Editors and you will be contacted directly with their queries. You will receive the galley proofs as soon as we have the manuscript copyedited.

Thank you for considering your results to our Journal.

With kind regards,

Cid Aimbiré M. Santos
Editor Braz Jf Pharmacognosy

***Mikania glomerata* e *M. laevigata*: estudos agronômicos, genéticos, morfoanatômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e uso nos programas de fitoterapia do Brasil - uma revisão**

João C. Gasparetto¹, Francinete R. Campos¹, Jane M. Budel², Roberto Pontarolo^{1*}

¹ Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Av. Pref. Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico, 80210-170, Curitiba, PR, Brasil, ² Laboratório de Farmacognosia, Unibrasil, Rua Konrad Adenauer, 442, Tarumã, 82820-540, Curitiba, PR, Brasil.

RESUMO

No Brasil as espécies de *Mikania laevigata* e *Mikania glomerata*, popularmente conhecidas como guaco, são amplamente utilizadas com evidências pré-clínicas para o tratamento de doenças onde estejam envolvidas suas ações broncodilatadoras, antialérgicas, antiasmáticas, anti-inflamatórias, antiulcerogênicas e relaxantes da musculatura lisa. Em virtude das propriedades terapêuticas atribuídas as essas espécies, ambas foram oficializadas na farmacopéia brasileira, e por serem bastante semelhantes, dificilmente são diferenciadas. Com o objetivo de contribuir com novas pesquisas, a presente revisão descreve, de forma sistematizada, sobre os aspectos farmacológicos, toxicológicos, químicos, agronômicos, morfoanatômicos, genéticos e o uso nos programas de fitoterapia do Brasil destas espécies. As principais diferenças e semelhanças entre as duas espécies são evidenciadas através da comparação das informações baseadas na literatura específica.

Unitermos: Asteraceae, *Mikania glomerata*, *Mikania laevigata*, guaco, plantas medicinais, revisão.

***Mikania glomerata* and *M. laevigata*: studies agronomic, genetic, anatomical, chemical, pharmacological, toxicological and use in herbal therapy programs in Brazil - a review**

ABSTRACT

In Brazil the species of *Mikania laevigata* and *M. glomerata*, popularly know as guaco, are widely used with preclinical evidence for the treatment of diseases where their actions are involved bronchodilators, antiallergic, anti-asthmatic, anti-inflammatory, antiulcerogenic and smooth muscles relaxant. Due to the therapeutic properties attributed to these species, both were included in the official Brazilian Pharmacopoeia, and because their similarity, are hardly differentiated. In order to contribute to the new research, this review describes of systematic form, about pharmacology aspects, toxicology, chemical, agricultural, anatomical, genetic and the use in herbal medicine programs in Brazil. The main differences and similarities between the two species are evidenced by comparing the information based on literature.

Key words: Asteraceae, *Mikania glomerata*, *Mikania laevigata*, guaco, medicinal plants, review.

INTRODUÇÃO

A família Asteraceae compreende, aproximadamente, 1500 gêneros e 23000 espécies (Judd et al., 1999), no qual está inserido o gênero *Mikania* que pertence à tribo Eupatorieae e abrange cerca de 430 espécies distribuídas principalmente em regiões neotropicais. Nos países andinos foram constatadas cerca de 150 espécies. No Brasil, o gênero, com 171 espécies, tem sua principal área de dispersão nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (Angely, 1965; Oliveira, 1972; Holmes, 1995; Ritter; Miotto, 2005).

Dentre as principais espécies medicinais pertencentes ao gênero *Mikania*, encontram-se a *Mikania glomerata* e a *M. laevigata*. Ambas ocorrem principalmente na Floresta Atlântica do Brasil, crescendo desde o estado de São Paulo até o Rio Grande do Sul, podendo, também, serem encontradas na Bahia, Paraguai e noroeste da Argentina (Moraes, 1997; Lima, 2003b; Freire et al., 2006). Em virtude de essas espécies compartilharem o mesmo habitat, estas dificilmente são distinguidas, pois apresentam características químicas, morfológicas e organolépticas semelhantes (Brasil, 2005; Oliveira et al., 1986a).

Mikania glomerata está oficializada desde 1929 na Farmacopéia Brasileira 1ª edição (Brasil, 1929; Brandão et al., 2006), enquanto que *M. laevigata* teve sua monografia incluída em 2005, 4ª edição (Brasil, 2005). Apesar da oficialização das folhas dessas espécies, grande parte dos produtos comercializados contém também outras partes aéreas, como caules e até mesmo inflorescências (Oliveira et al., 1985a; 1987). Em virtude das propriedades terapêuticas atribuídas a essas espécies, o xarope e a solução oral de *Mikania glomerata* foram incluídos no elenco de referência de medicamentos e insumos complementares para a assistência farmacêutica na atenção básica em saúde, conforme anexo II da portaria nº 3.237 de 24 de dezembro de 2007 (Brasil, 2007). Dessa forma, os medicamentos fitoterápicos a

base de guaco vem sendo utilizados em larga escala na rede de saúde pública, através da implantação de programas de fitoterapia em vários municípios nos estados brasileiro, tais como, Rio de Janeiro, São Paulo, Goiás, Alagoas, Amapá, Ceará, Pernambuco, Espírito Santo, Distrito Federal, Pará, Paraíba, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Brasil, 2006; Brasil, 2008).

O uso amplamente difundido, as diferenças morfológicas pouco expressivas e o grande número de informações não sistematizadas disponíveis na literatura, justificam a importância de uma revisão dos estudos realizados sobre estas espécies. As principais diferenças e semelhanças entre elas poderão ser evidenciadas na comparação das informações obtidas dos estudos científicos realizados sobre aspectos farmacológicos, toxicológicos, químicos, agrônômicos, morfoanatômicos e genéticos.

COLETA DE DADOS

Os dados levantados para a composição desta revisão foi realizado através de uma extensiva pesquisa realizada no *Chemical Abstract*, *PubMed*, *Web of Science*, *Google acadêmico* e *Science direct*. As palavras chaves utilizadas na pesquisa (em várias combinações) foram: *Mikania*, *M. glomerata*, *M. laevigata*, estudos agrônômicos, estudos anatômicos, estudos toxicológicos, estudos químicos, análise fitoquímica, atividades biológicas e atividades farmacológicas. As referências encontradas foram então consultadas e utilizadas para comporem as tabelas do artigo. Foram considerados, para fins desta revisão, somente dados obtidos de livros, teses, dissertações e artigos publicados em revistas indexadas, não sendo consideradas comunicações em congressos e simpósios.

***Mikania glomerata* Spreng. E *Mikania laevigata* Sch. Bip. Ex Baker**

Mikania glomerata é conhecida vulgarmente como coração-de-jesus, guaco-cheiroso, cipó-caatinga e erva-de-cobra e *Mikania laevigata* como guaco-de-casa e guaco-do-mato (Alice et al., 1995; Oliveira et al., 1986a). Estas espécies são utilizadas popularmente por suas propriedades antiespasmódica, excitantes, sudoríferas, antisifilíticas, antiasmáticas, anti-inflamatórias, tônica, depurativa, antipirética, antiofídicas, picadas de escorpião, artrite, reumatismo e nevralgias, expectorante, balsâmico, eczema pruriginoso, estimulante do apetite, no tratamento da gripe e doenças respiratórias em geral além de ser indicado para inflamações da garganta, utilizando-se as folhas cozidas para gargarejo (Coimbra 1942, Lucas, 1942, Neves; Sá, 1991; Ruppelt, 1991; Galvani; Barreneche, 1994; Alice et al., 1995; Cortez et al., 1999; Matos, 2000; Pereira et al., 2004; Maiorano, 2005; Vendruscolo; Mentz, 2006; Souza; Felfili, 2006). Ainda como uso etnofarmacológico, estudos clínicos observacionais demonstraram que *M. glomerata* possui atividade antimalárica (Botsaris, 2007).

Estudos agronômicos, genéticos e morfoanatômicos

Mikania laevigata e *M. glomerata* têm sido empregadas com frequência uma em substituição a outra. Este fato está relacionado principalmente com a distribuição geográfica destas espécies, pois ambas ocorrem com frequência no mesmo local e possuem grande semelhança morfológica, sendo, portanto, bastante confundidas. Devido a essa grande semelhança, um estudo comparativo com extratos fluidos elaborados com estas duas espécies, revelou composição química semelhante, sendo, portanto, a *M. laevigata* considerada como

sucedânea da *M. glomerata* (Oliveira et al, 1986a; Lima; Biasi, 2002). Estudos agrônômicos, genéticos e morfoanatômicos para ambas as espécies estão apresentados na Tabela 1.

Processos de extração, separação e isolamento de constituintes químicos

A cumarina simples (1,2-benzopirona) ocorre em maior concentração na região superior de folhas jovens de *Mikania glomerata* e *M. laevigata*, sendo considerada o principal marcador químico (Castro, 2002; Brasil, 2008). Sua presença na planta caracteriza o odor aromático agradável lembrando baunilha (Oliveira et al., 1894). Neste sentido, inúmeros processos de extração e separação têm sido relatados na literatura. Alguns exemplos podem ser citados, tais como, a obtenção de extratos aquosos, hidroalcoólicos, etanólicos, hexânicos, clorofórmicos, diclorometânicos, tinturas, e óleos essenciais (Oliveira; Saito; Garcia, 1993; Fierro et al. 1999; Santos et al., 1999; Schenkel et al., 2002; Maiorano et al., 2005; Peregrino; Leitão, 2005; Contini et al., 2006; Rehder; Sartoratto; Rodrigues, 2006; Muceneeki et al., 2009). Apesar do amplo emprego desses extratos, existem poucos relatos na literatura sobre o controle dos parâmetros físicos e químicos dos extratos, sendo avaliados apenas a densidade, pH e o resíduo seco (Oliveira, Saito, Garcia, 1993; Aboy et al., 2000). Neste contexto a Farmacopéia Brasileira (2005) relata apenas o controle de qualidade da droga vegetal sendo avaliadas as características organolépticas, descrições macroscópicas e microscópicas, identificação através de cromatografia em camada delgada, materiais estranhos, teor de água, cinzas totais e doseamento da 1,2-benzopirona por CLAE.

Desses extratos alguns métodos de análise visando separação, purificação e consequentemente o isolamento do marcador químico 1,2-benzopirona tem sido relatados, dentre eles podemos citar, cromatografia em camada delgada, cromatografia em coluna, cromatografia líquida de alta eficiência preparativa, cromatografia líquida de alta eficiência e

cromatografia gasosa (Bighetti et al., 2005; Maiorano et al., 2005; Muceneeki et al., 2009; Yatsuda et al., 2005).

Estudos fitoquímicos dessas duas espécies têm sido amplamente realizados e tem resultado no isolamento de diversos compostos, entre eles: cumarinas, ácidos, álcoois, ésteres diterpênicos, ácidos, aldeídos e ésteres orgânicos, terpenos, entre outros. Dessa forma, vários extratos e frações de *M. laevigata* e *M. glomerata* têm sido avaliados quanto à sua composição química, sendo estes dados apresentados na Tabela 2.

Atividades farmacológicas

No Brasil, *M. laevigata* e *M. glomerata* são amplamente utilizadas com evidências pré-clínicas para o tratamento de diversos tipos de doenças em que sejam benéficas as ações broncodilatadora, antiinflamatória, antiespasmódica, no tratamento das úlceras gástricas, entre outros.

Diversos autores atribuem o efeito farmacológico do guaco às cumarinas (Pedroso et al., 2008), sendo estas descritas com diversas atividades terapêuticas importantes, tais como, anti-inflamatória, imunossupressora, hipolipidêmico, relaxante vascular, anticoagulante, hipotensora, espasmolítica, antioxidante, antiofídica, inibição da replicação do vírus HIV-1, entre outros (Pereira et al., 1994; Hoult 1996; Vlientinck, 1998). Além disso, a agência regulamentadora de medicamentos do Brasil (ANVISA) considera a cumarina como marcador químico da *M. glomerata* (ANVISA, 2004). De acordo com a resolução RE 89, de 16 de março de 2004, que determina a lista de registro simplificado de fitoterápicos no Brasil, a dose diária recomendada para este marcador pode variar entre 0,525 e 4,890 mg (Brasil, 2004).

Estudos realizados com *M. glomerata* e *M. laevigata* em diferentes condições de extração e líquido extrator apresentaram diferentes teores de cumarina, e que independente do teor encontrado em extratos de *M. glomerata* a atividade antiespasmódica não era afetada (Aboy et al., 2002). Nessa mesma espécie, em ensaios com extratos aquoso e hidroalcoólico utilizando modelos de traquéia de cobaia e brônquio humano isolados verificou-se que o efeito relaxante sobre a musculatura lisa do trato respiratório pode estar relacionado ao bloqueio dos canais de cálcio, sendo que a presença de cumarina nos extratos não interferiu nos resultados (Soares de Moura et al., 2002). Em ensaios farmacológicos *in vivo* e *in vitro* realizados com o extrato hidroalcoólico e uma solução padrão de cumarina, ambos demonstraram efeitos espasmolítico, antiedematogênico e broncodilatador. Além disso, diferentes intensidades nos efeitos farmacológicos foram observadas no extrato indicando que, além da cumarina, outros compostos biologicamente ativos estão presentes (Leite et al., 1993). Os dados com as atividades farmacológicas em diferentes tipos de extratos dessas espécies estão apresentados na tabela 3.

Os diterpenos também tem despertado bastante interesse, no que se refere à ação farmacológica, principalmente os que constituem a classe dos cauranos, como por exemplo o ácido caurenóico isolado de *M. glomerata* e *M. laevigata* (Tabela 2). Este tem apresentado várias atividades, dentre elas ação antibacteriana, anti-parasitária, anti-câncer, efeito hemolítico contra eritrócitos de ratos e humanos e também atividade antifúngica (Barbosa et al., 1994; Guisalberti, 1997; Lobitz et al., 1997; Silva et al., 2002; Vieira et al. 2002; Costa-Lotufo et al., 2002; Mongelle et al., 2002; Wilkens et al., 2002; Cotoras et al., 2004). Importante mencionar foi sua atividade antinociceptiva induzida por ácido acético em camundongos, sendo também um potente relaxante da contração uterina através de mecanismos independentes de receptores β_2 adrenérgicos e, ao que tudo indica antagonista aos canais de cálcio (Block et al., 1998; Cunha et al., 2003). A atividade antinociceptiva também

foi observada em camundongos com extratos brutos de *M. glomerata* e em uma substância hidrossolúvel deste extrato, porém os dados não se encontram publicados em revistas especializadas, somente comunicação em congresso (Arruda et al., 1996; Soares de Arruda et al., 2001, Soares de Arruda et al., 2001b; Paula et al., 2002).

Estudos toxicológicos

Vários ensaios avaliando a toxicidade de extratos, solução, xaropes e infusão de *M. glomerata* e *M. laevigata* foram relatados. Extratos fluidos dessas duas espécies apresentaram baixa toxicidade em ratos (Oliveira et al., 1985b). Estudos utilizando extrato hidroalcoólico de *M. glomerata* e xarope de *M. laevigata*, administrados em ratos no ciclo espermato gênico foram realizados, não sendo observadas alterações na ingestão alimentar, corpo e peso do órgão reprodutor, produção de gametas e níveis de testosterona sérica (Sá et al., 2003; Graça, 2007a). A ausência de efeitos mutagênicos e de problemas de fertilidade também foi observada quando avaliado número de embriões implantados, reabsorção e corpo lúteo, acasalamento, gestação, perda de pré-implantação, índices de reabsorção, desmame e número de descendentes (Sá, 2006).

Em estudo com o extrato hidroalcoólico de *M. laevigata*, ensaios pré-clínicos avaliando dose única, sub-crônica e crônica, demonstraram ausência de toxicidade para o xarope e solução de *M. laevigata* quando administrada via intraperitoneal. Adicionalmente, não houve alterações nas funções hepática, renal, pancreática e hematológicas em ratos machos e fêmeas. (Graça et al., 2007b).

A infusão de *M. laevigata* foi avaliada na verificação de atividade mutagênica em *Salmonella typhimurium* através de doseamento microscópico. Os resultados indicaram alta porcentagem na inibição de atividade mutagênica (Fernandes, 2003). Estudos *in vitro* de

genotoxicidade e atividade mutagênica foram realizados através dos ensaios de cometa e micronúcleos, utilizando infusão e extrato macerado com etanol 80% de *M. glomerata*. Os resultados demonstraram dano ao DNA dose dependente para a infusão em 100 e 200% da dose diária recomendada (DDR) e em 200 e 400 % de DDR para o extrato macerado. Os estudos também relataram que existe uma diferença significativa na concentração e na composição química no extrato e na infusão, onde se verificou um teor de cumarina 55 vezes maior no extrato que na infusão. No entanto, não foi evidenciada nenhuma relação direta desse marcador com a proteção ou os danos causados ao DNA em hepatócitos (Costa et al, 2008). Com relação a estudos clínicos toxicológicos de associações de plantas contendo *Mikania glomerata*, existem apenas dois relatos na literatura para a avaliação da segurança clínica (Soares et al., 2006; Tavares et al, 2006).

Emprego do guaco nos programas de fitoterapia no Brasil

Os medicamentos fitoterápicos a base de guaco vem sendo utilizados em larga escala na rede de saúde pública, através da implantação de programas de fitoterapia em vários municípios nos estados brasileiro, tais como, Rio de Janeiro, São Paulo, Goiás, Alagoas, Amapá, Ceará, Pernambuco, Espírito Santo, Distrito Federal, Pará, Paraíba, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, tendo em vista o seu baixo custo, eficácia e toxicidade aceitável (Brasil, 2006; Brasil, 2008).

O guaco é um fitoterápico tradicional, bem aceito pela população e que tem se mostrado muito eficaz como broncodilatador e expectorante. Nesse sentido, o produto veio em momento oportuno em termos de atendimento às necessidades dos pacientes do programa de fitoterapia “Verde Vida” implantado na Secretaria Municipal de Saúde de Maringá/PR, uma vez que não existia opção medicamentosa nessa indicação. Devido aos efeitos

broncodilatadores do guaco promoverem a tosse, e dessa forma auxiliarem a expectoração, tal perfil de atividade não agradou alguns pacientes que buscam antitussígenos, principalmente as crianças (Ogava et al., 2003). No estado de São Paulo uma das plantas mais utilizadas na rede pública de saúde é o guaco. Entretanto, poucos municípios do Estado utilizam a fitoterapia como terapêutica e a falta de incentivo por parte dos governos municipais, em alguns municípios onde a fitoterapia estava implantada, levou a desativação de alguns projetos. Mesmo sem o incentivo do governo municipal, alguns médicos da Rede Pública de Saúde continuam prescrevendo fitoterápicos, devido a esta terapêutica fazer parte de sua prática médica, ser bem aceita e acessível à população (Oliveira; Simões; Sassi, 2006). No município de Maracanaú/CE, o xarope a base de guaco é de grande relevância no tratamento de afecções do trato respiratório, com predominância de 63,8% das prescrições de fitoterápicos. Além disso, demonstrou uma alta aceitação e adesão por parte dos profissionais de saúde, demonstrando mais de 90% de êxito terapêutico dos usuários (Silva et al., 2006). Outros programas de fitoterapia tais como, Farmácia Viva de Betim/MG (Guimarães; Medeiros; Vieira, 2006), Programa de Fitoterapia e Homeopatia de Ribeirão Preto/SP (Pires; Borella, 2004), Programa de plantas medicinais/fitoterapia do Estado do Rio de Janeiro (Secretaria Estadual da Saúde do Rio de Janeiro, 1996), Programa de Terapia Alternativa Fitoterápica de Santa Tereza/ES e Marilândia/ES (Taufner; Ferraço; Ribeiro, 2006), Botica da família de Campinas/SP (Secretaria Municipal da Saúde, 2001), Fitoviva de Cuiabá/MT (Secretaria Municipal da Saúde, 2004), dentre outros, utilizam o guaco para tratamento de afecções respiratórias. Portanto, confirma-se o valor do guaco no apoio às atividades básicas de saúde.

CONCLUSÃO

Mikania glomerata e *M. laevigata* tem sido amplamente utilizadas pela população para o tratamento de afecções respiratórias. Em virtude das propriedades terapêuticas atribuídas a essas espécies, os fitoterápicos a base de guaco tem sido utilizados com sucesso nos programas de fitoterapia na rede de atenção básica à saúde em diversos municípios dos Estados Brasileiro. Apesar do amplo uso desses fitoterápicos, a maioria dos artigos publicados não traz descrições dos parâmetros físicos e químicos detalhadas dos fitopreparados, sendo que grande parte desses trabalhos não seguem as atuais diretrizes internacionais para pesquisa da avaliação da segurança de plantas medicinais. Além disso, estudos pré-clínicos e clínicos devem ser realizados nessas espécies de forma a contribuir com os benefícios do guaco. Diversos autores atribuem o efeito farmacológico do guaco à cumarina. Entretanto, outros metabólitos descritos como majoritários nas respectivas plantas, provavelmente contribuem com o efeito farmacológico dos extratos medicinais, e portanto, maiores investigações são necessárias. Neste sentido, essa revisão vem auxiliar e estimular novas investigações com essas espécies a fim de corroborar para a qualidade, segurança e eficácia dos produtos para fins farmacêuticos.

REFERÊNCIAS

Aboy AL 1999. *Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas de Mikania glomerata Sprengel (guaco) (Asteraceae)*. Porto Alegre, 120p. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- Aboy AL, Ortega GG, Petrovick PR, Langeloh A, Bassani VL 2000. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas de *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae), guaco. *Rev Bras Ciênc Farm* 36: 165-172.
- Aboy AL, Ortega GG, Petrovick PR, Langeloh A, Bassani VL 2002. Atividade antiespasmódica de soluções extrativas de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco). *Acta Farm Bonaerense* 21: 185-191.
- Amaral RR, Arcenio-Neto F, Carvalho ES, Teixeira LA, Araújo GL, Sharapin N, Testa B, Gnerre C, Rocha L 2003. Avaliação da atividade IMAO e antibacteriana de extratos de *Mikania glomerata* Sprengel. *Rev Bras Farmacogn* 13: 24-27.
- Andrade ECB, Alves SP, Takase I 2005. Extração sequencial de cobre, ferro e zinco em ervas medicinais. *Ciênc Tecnol Aliment* 25: 844-848.
- ANVISA 2004 RE n. 89 de 18/03/04 – Lista de registro simplificado de fitoterápicos. Determina a publicação da Lista de registro simplificado de fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, 18/03/2004.
- Arruda AMS, Allegretti CH, Teixeira SRS, Santos CAM 1996. Atividade antinociceptiva do extrato bruto hidroalcoólico de *Mikania glomerata* Spreng. *XVI Reunião anual da federação de sociedades de biologia experimental*, Caxambu, Brasil.
- Azevedo SKS, Silva IM 2006. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Acta Bot Bras* 20: 185-194.
- Baratto L, Lang KL, Vanz DC, Reginatto FH, Oliveira JB, Falkenberg M 2008. Investigação das atividades alelopática e antimicrobiana de *Mikania laevigata* (Asteraceae) obtida de cultivos hidropônico e tradicional. *Rev Bras Farmacogn* 18: 577-582.
- Barbosa AD, Ferreira RCV, Valente PHM 1994. Atividade antimicrobiana de extratos fluidos de plantas medicinais brasileiras. *Lecta-USF* 12: 153-163.

- Betoni JEC, Mantovani RP, Barbosa LN, di Stasi LC, Fernandes Junior A 2006. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 387-390.
- Biavatti MW, Koerich CA, Henck CH, Zucatelli E, Martineli FH, Bresolin TB, Leite SN 2004. Coumarin content and physicochemical profile of *Mikania laevigata* extracts. *Z Naturforsch* 59: 197-200.
- Bigueti AE 1999. Atividade antiulcerogênica do extrato bruto hidroalcoólico e da cumarina isolada da *Mikania laevigata* Schulpz Bip. Campinas, 100p. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em farmacologia, Universidade Estadual de Campinas.
- Bighetti AE, Antonio MA, Kohn LK, Rehder VL, Foglio MA, Possenti A, Vilela L, Carvalho JE 2005. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. *Phyton* 12: 72-77.
- Botsaris AS 2007. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. *J Ethnobiol Ethnomed* 1: 13-18.
- Block LC, Scheidt C, Quintão ARS, Cechinel-Filho V 1998. Phytochemical and pharmacological analysis of different parts of *Wedelia paludosa* DC. (Compositae). *Pharmazie* 53: 716-718.
- Brandão MGL, Cosenza GP, Moreira RA, Monte-Mor RLM 2006. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Oficial Pharmacopeia. *Rev Bras Farmacogn* 16: 408-420.
- Brasil, Resolução RE 89 - Determina a lista de registro simplificado de fitoterápicos no Brasil. ANVISA, Diário Oficial da União, Brasília - DF, março, 2004.

- Brasil, Fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos. Ministério da Saúde. Secretaria da ciência, tecnologia e insumos estratégicos. Brasília-DF, 2006.
- Brasil, Portaria GM nº 3.237. Aprova as normas de execução e de financiamento da assistência farmacêutica na atenção básica em saúde. Ministério da Saúde. Brasília-DF, dezembro, 2007.
- Brasil, Instrução normativa nº5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos. Ministério da Saúde. Brasília-DF, dezembro, 2008.
- Brasil, 1º seminário internacional de práticas integrativas e complementares em saúde. Ministério da Saúde. Secretaria da ciência, tecnologia e insumos estratégicos. Brasília-DF, maio, 2008.
- Cabral LM, Santos TC, Alhaique F 2001. Development of a profitable procedure for the extraction of 2-H-1-benzopyran-2-one (coumarin) from *Mikania glomerata*. *Drug Develop Ind Pharm* 27: 103-106.
- Capaldi MLPM 2007. *Reguladores vegetais no desenvolvimento de plantas de guaco (Mikania glomerata Sprengel)* Marília, 75p. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade de Marília.
- Carvalho JE, 2006. Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e síntese. *Rev Multic* 07: 1-18.
- Castro EM 2002. *Alterações anatômicas fisiológicas e fitoquímicas em Mikania glomerata Sprengel (guaco) sob diferentes fotoperíodos e níveis de sombreamento*. Lavras, 221p. Tese de Doutorado – Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras.
- Castro EM, Pinto JEBP, Avarenga AA, Lima Junior EC, Bertolucci SKV, Silva Filho JL, Vieira CV 2003. Crescimento e anatomia foliar de plantas jovens de *Mikania*

- glomerta* Sprengel (guaco) submetidas a diferentes fotoperíodos. *Ciênc agrotec* 27: 1293-1300.
- Castro EM, Pinto JEBP, Bertolucci SKV, Malta MR, Cardoso MG, Silva FAM 2006. Coumarin contents in young *Mikania glomerata* plants (guaco) under different radiation levels and photoperiod. *Acta Farm. Bonaerense* 25: 387-392.
- Coimbra R 1942. *Notas de fitoterapia*. Rio de Janeiro: L.C.S.A.
- Colodi FG, Ramos NLC, Zuffellato-Ribas KC, Ribas LLF, Koehler HS 2008. Propagação vegetativa de guaco com adição de ácido naftalenoacético. *Scientia Agraria* 9: 95-98.
- Contini SHT, Santos PA, Veneziani RCS, Pereira MAS, França SC, Lopes NP, Oliveira DCR 2006. Differences in secondary metabolites from leaf extracts of *Mikania glomerata* Sprengel obtained by micropropagation and cuttings. *J Pharmacognosy* 16: 596-598
- Cortez LER, Jacomossi E, Cortez DAG 1999. Levantamento de plantas medicinais usadas na medicina popular de Umuarama, PR. *Arquivos de Ciências da Saúde UNIPAR* 3: 97-104.
- Costa-Lotufo LV, Cunha GMA, Farias PAM, Viana GSB, Cunha KMA, Pessoa C, Moraes MO, Silveira ER, Gramosa NV, Rao VSN 2002. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* óleo-resin. *Toxicon* 40: 1231-1234.
- Costa RJ, Diniz A, Montovani MS, Jordão BQ 2008. In vitro study of mutagenic potencial of *Bidens Pilosa* and *Mikania glomerata* Sprengel using the comet and micronucleos assays. *J. Ethnopharmacol* 118: 86-93.

- Cotoras M, Folch C, Mendoza L 2004. Characterization of the antifungal activity on *Botrytis cinerea* of the natural diterpenoids kaurenoic acid and 3beta-hydroxy-kaurenoic acid. *J Agri Food Chem* 52: 2821-2826.
- Cunha KMA, Paiva LAF, Santos FA, Gramosa NV, Silveira ER, Rao VSN 2003. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on rat uterus *in vivo*. *Phyt Research* 17: 320-324
- Duarte MC, Figueira GM, Pereira B, Magalhães PM, Delamelina C 2004. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQPA/UNICAMP. *Rev Bras Farmacogn* 14: 6-8.
- Duarte MC, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VL, Delamelina C 2005. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 97: 305-311.
- Duarte MCT, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA, Figueira GM, Sartoratto A 2007. Activity of essencial oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *J Ethnopharmacol* 111: 197-201.
- Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil 1929. 1 ed. São Paulo: Nacional.
- Farmacopéia brasileira 2005. 5 ed. São Paulo: Atheneu.
- Fernandes JB, Vargas VM 2003. Mutagenic and antimutagenic potential of the medicinal plants *M. laevigata* and *C. xanthocarpa*. *Phytother Res* 17: 269-273.
- Fierro IM, Silva ACB, Lopes CS, Soares de Moura, R, Barja-Fidalgo C 1999. Studies on the anti- allergic activity of *Mikania glomerata*. *J Ethnopharmacol* 66: 19–24.
- Franchi, MS 2000. *Contribuição ao estudo farmacognóstico da folha de Mikania glomerata Sprengel, Asteraceae*. Curitiba, 87p. Dissertação de mestrado – Setor de ciências biológicas, Universidade Federal do Paraná.

- Freire SE, Urtubey E, Sancho G, Bayón ND, Katinas L, Gutiérrez DG, Giuliano DA, Sáenz AA, Iharlegui L, Delucchi, G 2006. Inventario de la biodiversidad vegetal de la provincia de Misiones: Asteraceae. *Darwiniana* 44: 375-452.
- Freitas TP, Silveira PC, Rocha LG, Rezin GT, Rocha J, Zanette VC, Romão PT, Pizzol FD, Pinho RA, Andrade VM, Streck EL 2008. Effects of *Mikania glomerata* Spreng. and *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker (Asteraceae) Extracts on pulmonary inflammation and oxidative stress caused by acute coal dust exposure. *J Med Food* 11 (4): 761-766.
- Galvani FR, Barreneche ML 1994. Levantamento das espécies vegetais utilizadas em medicina popular no município de Uruguaiana (RS). *Rev FZVA* 1: 1-14.
- Graça C, Freitas CS, Baggio CH, Dalsenter PR, Marques, MCA 2007a. *Mikania laevigata* syrup does not induce side effects on reproductive system of male Wistar rats. *J Ethnopharmacol* 111: 29-32.
- Graça C, Baggio CH, Freitas CS, Rattmann YD, Souza LM, Cipriani TR, Sassaki GL, Rieck L, Pontarolo, R, Santos JE, Marques, MCA 2007b. *In vivo* assessment of safety and mechanisms underlying *in vitro* relaxation induced by *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker in the rat trachea. *J Ethnopharmacol* 112: 430-439.
- Gimarães J, Medeiros JC, Vieira LA 2006. Programa fitoterápico Farmácia Viva no SUS-Betim. *Divulgação em Saúde para Debate* 36: 41-47.
- Guisalberti EL 1997. The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. *Fitoterapia* 23: 303-325.
- Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1027-1031.

- Holmes WC 1995. A review preparatory to an infrageneric classification of *Mikania* (tribe: Eupatorieae). Pp. 239-254 In: Hind DJN, Jeffrey C, Pope GV (eds) *Advances in Compositae Systematics*, Royal Botanical Gardens: Kew.
- Hoult JRS, Payá M 1996. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen Pharmacol* 27: 713-722.
- Judd WS, Stevens PF, Campbell CS, Kellogg EA 1999. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Sunderland: Sinauer.
- Leite MGR, Souza CL, Silva MAM, Moreira LKA, Matos FJA, Viana GSB 1993. Estudo farmacológico comparativo de *Mikania glomerata* Spreng (guaco), *Justicia pectoralis* Jacq (anador) e *Torresea cearensis* Fr. All (cumarú). *Rev Bras Farm* 1: 12-15.
- Lima NP, Biasi LA 2002. Estaquia semilenhosa e comparação de metabólitos secundários em *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. *Scientia Agraria* 1-2: 113-132.
- Lima NP, Biasi LA, Zanette F, Nakashima T 2003a. Estaquia semilenhosa e análise de metabólitos secundários de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker). *Rev Bras Pl Med* 5: 47-54.
- Lima NP, Biasi LA, Zanette F, Nakashima T 2003b. Produção de mudas por estaquia de duas espécies de guaco. *Hort Bras* 21: 106-109
- Lorenzi H, Matos FJA 2008. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- Lucas V. 1942. Estudo farmacognóstico do guaco *Mikania glomerata* Sprengel. *Rev Flora Medic* 9: 101-132.

- Magalhães PM 2000. Agrotecnología para el cultivo de guaco o guaco oloroso. In: Martinez A, Vicente J, Bernal M, Henry Y, Carceres A. *Fundamentos de agrotecnologia de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas*. Santafé de Bogotá: CAB/CYTED.
- Maiorano VA, Marcussi S, Daher MA, Oliveira CZ, Couto LB, Gomes OA, Franca SC, Soares AM, Pereira PS 2005. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. *J Ethnopharmacol* 102: 364-370.
- Matos FJA 2000. *Plantas medicinais: Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil*. Fortaleza: Imprensa Universitária – UFC.
- Milan P, Hayashi AH, Appezzato da Glória B 2006. Comparative leaf morphology and anatomy of three Asteraceae species. *Braz Arch of Biol and Tech* 49: 135-144.
- Mongelli E, Pomilio AB, Sanches JB, Guerra FM, Massanet GM 2002. ent-Kaur-16-em-19-oic acid, a KB cells cytotoxic diterpenoid from *Elaeoselinum foetidum*. *Phytother Res* 16: 387-388.
- Muceneeki RS, Amorim CM, Cesca TG, Biavatti MW, Bresolin TB 2009. A simple and validated LC method for the simultaneous determination of three compounds in *Mikania laevigata* extracts. *Chromatographia* 69: 219-223.
- Neves LJ, Sá MFA 1991. Contribuição ao estudo das plantas medicinais *Mikania glomerata* Sprengel. *Rev Bras Farm* 72: 42-47.
- Ogava SEN, Pinto MTC, Kikuchi T, Meneguetti VAF, Martins DCB, Coelho SAD, Marques MJNJ, Virmond JCS, Monteschio P, D'aquino M, Marques LC 2003. Implantação do programa de fitoterapia "Verde Vida" na secretaria de saúde de Maringá. *Rev Bras Farmacogn* 13: 58-62.

- Oliveira F, Alvarenga MA, Akisue G, Akisue MK 1984. Isolamento e identificação de componentes químicos de *Mikania glomerata* Sprengel de *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. *Rev Farm Bioq USP* 2: 169-183.
- Oliveira F, Akisue G, Akisue MK, Mancini B, Chumzum M 1985a. Morfodiagnose do guaco – *Mikania glomerata* Sprengel – Compositae. *Rev Ciênc Farm* 7: 17-26.
- Oliveira F, Oga S, Akisue G, Akisue MK 1985b. Parâmetros físicos e químicos e efeito antiedema dos extratos fluídos de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e de guaco-do-mato (*Mikania laevigata* Schultz Bip ex Baker). *Anais Farm Quim* 25: 50-54.
- Oliveira F, Akisue G, Akisue MK, Jorge LIF 1986a. Morfodiagnose das folhas e das partes reprodutivas de *M. laevigata* Schultz Bip ex Baker. *Rev Bras Farmacogn* 1: 20-34.
- Oliveira F, Akisue G, Akisue MK, Jorge LIF 1986b. Morfodiagnose de *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker – Guaco-do-mato – estudo do axófito. *Rev Bras Farmacogn* 1: 45-57.
- Oliveira F, Akisue G, Akisue MK, Mancine B, Chumzum M 1987. Morfodiagnose do axófito do guaco: *Mikania glomerata* Sprengel. *Rev Ciên Farm* 8: 11-24.
- Oliveira F, Saito ML, Garcia OL 1993. Caracterização cromatográfica em camada delgada do extrato fluido de guaco – *Mikania glomerata* Sprengel. *LECTA – USF* 11: 43-55.
- Oliveira F, Saito ML, Garcia LO 1994. Morfologia externa das partes aéreas e anatomia foliar das espécies brasileiras de *Mikania* secção *Globosae* Robinson – visão farmacognóstica. *Lecta - USF* 1: 23-65.
- Oliveira F, Rosa FOR, Edna TMK 1999. Estudo farmacognóstico da almécega-da-praia – *Mikania conferta* Gardn. *Lecta – USF* 17: 43-68.

- Oliveira F, Rodrigues RFO, Bastos DHM, Pereira FH 2000. Caracterização morfohistológica e verificação da atividade microbiológica da espécie vegetal *Mikania cordifolia* (Lf) Willd. *Lecta - USF* 18: 33-63.
- Oliveira MJR, Simões MJS, Sassi CRR 2006. Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no estado de São Paulo, Brasil. *Planta Med* 8: 39-41.
- Paula KM, Vargas Júnior A, Kanis LA, Peters RR 2002. Avaliação da atividade anti-nociceptiva do extrato bruto hidroalcoólico de *Mikania glomerata* Sprengel (EBMG). In: XXXIV Congresso brasileiro de farmacologia e terapêutica experimental, Águas de Lindóia, Brasil.
- Pedroso APD, Santos SC, Steil AA, Deschamps F, Barison A, Campos F, Biavatti MW 2008. Isolation of syringaldehyde from *Mikania laevigata* medicinal extract and its influence on the fatty acid profile of mice. *Rev Bras Farmacogn* 18: 63-69.
- Peregrino CAF, Leitão SG 2005. Chromatographical profiles of fluid extracts and tinctures obtained from *Mikania glomerata* Sprengel sterilized by gamma ray irradiation. *Rev Bras Farmacogn* 15: 237-242.
- Pereira NA, Pereira BMR, Nascimento MC, Parente JP, Mors, WB 1994. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom; IV. Protection against jararaca venom by isolated constituents. *Planta Med.* 60: 99-100.
- Pereira AMS, Menezes Jr. A, Camara FLA, Franca SC 1998. Influence of fertilizer on coumarin content and biomass production in *Mikania glomerata* Sprengel. *J of Herbs, Spices & Medic Plan* 6: 29-36.
- Pereira AMS, Camara FLA, Celeghini RMS, Vilegas JHY, Lanças FM, França SC 2000. Seasonal variation in coumarin content *Mikania glomerata*. *J of Herbs, Spices & Med Plan* 7: 1-10.

- Pereira RC, Oliveira MTR, Lemos GCS 2004. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes – RJ. *Rev Bras Farmacogn* 14: 37-40.
- Pessini GL, Holetz FB, Sanches NR, Cortez DAG, Dias Filho BP, Nakamura CV 2003. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. *Rev Bras Farmacogn* 13: 21-24.
- Pires AM, Borella JC 2004. Prática alternativa de saúde na atenção básica da rede SUS de Ribeirão Preto (SP). *Divulgação em Saúde para Debate* 30: 56-58.
- Radunz LL 2004. Efeito da temperatura do ar de secagem no teor e na composição dos óleos essenciais de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e hortelã-comum (*Mentha x villosa* Huds). Viçosa, 90p. Tese de doutorado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa.
- Rehder VLG, Sartoratto A, Rodrigues MVN 2006. Essential oils composition from leaves, inflorescences and seeds of *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker and *Mikania glomerata* Sprengel. *Rev. Bras. Pl. Med.* 8: 116-118.
- Ritter MR, Miotto STS 2005. Taxonomia de *Mikania* Willd. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Hoehnea* 32: 309-359.
- Ruppelt BM, Pereira EF, Gonçalves LC, Pereira NA 1991. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom: I. Analgesic and anti-inflammatory activities. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 203-205.
- Sá RCS, Leite MN, Reporedo MM, Almeida RN 2003. Evaluation of long-term exposure to *Mikania glomerata* (Sprengel) extract on male Wistar rats reproductive organs, sperm production and testosterone level. *Contraception* 67: 327-331.
- Sá RCS, Leite MN, Peters VM, Guerra MO, Almeida RN 2006. Absence of mutagenic effect of *Mikania glomerata* hydroalcoholic extract on adult Wistar rats *in vivo*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*: 49: 599-604.

- Salgado HRN, Roncari AFF, Moreira RRD 2005. Antidiarrhoeal effects of *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) leaf extract in mice. *Rev Bras Farmacogn* 15: 205-208.
- Santos PA, Pereira MAS, França SC, Lopes NP 1999. Esteróides e cumarina em calos de *Mikania glomerata* Sprengel. *Rev Bras Cien Farm* 35: 231-235.
- Santos SC, Krueger CL, Steil AA, Krueger MR, Biavati MW, Wisniewski-Junior A 2006. LC characterization of guaco medicinal extracts, *Mikania laevigata* and *M. glomerata*, and their effects on allergic pneumonitis. *Planta Med* 72: 679-684.
- Schenkel, EP, Rücher G, Manns D, Falkenberg MB, Matzenbacher NI, Sobral M, Mentz LA, Bordignon SAL, Heinzmann BM 2002. Screening of Brazilian plants for the presence of peroxides. *Rev Bras Cienc Farm* 38: 191-196.
- Secretaria Municipal da Saúde de Campinas. Departamento de Saúde. Portaria Municipal 13/01. Programa de Práticas Integrativas e Complementares de Campinas. Campinas – SP, 2001.
- Secretaria Municipal da Saúde de Cuiabá. Lei Municipal nº 4.188. Programa de Fitoterápicos e Plantas Medicinais. Cuiabá – MT, 2004.
- Secretaria Estadual da Saúde do Rio de Janeiro. Subsecretaria de ações e serviços de saúde. Gerência de práticas integrativas e complementares. Lei Estadual nº 2.537. PROPLAM - Programa Estadual de Plantas Medicinais, Rio de Janeiro – RJ, 1996.
- Silva CR, Gomes VS, Kulkamp IC, Kanis LA 2008. Método espectroscópico para determinação de cumarina em xarope de *Mikania glomerata* Sprengel. *Rev Bras Farmacogn* 18: 594-599.

- Silva MIG, Gondim APS, Nunes IFS, Souza FCF 2006. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção a saúde da família no município de Maracanaú (CE) *Rev Bras Farmacogn* 16: 455-462.
- Soares AKA, Carmo GCC, Quental DP, Nascimento DF, Bezerra FAF, Moraes OM, Moraes MEA 2006. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. *Rev Bras Farmacogn* 16: 447-454.
- Soares de Arruda AM, Allegretti CH, Teixeira SRS, Santos CAM 2001a. Atividade antinociceptiva do extrato bruto hidroalcoólico de *Mikania glomerata* S. In: XVI Reunião anual da federação de sociedades de biologia experimental. Caxambú, Brasil.
- Soares de Arruda AM, Santos FCP, Santos CAM 2001b. Ação antinociceptiva do MG05, isolado de extrato bruto hidroalcoólico de folhas de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco). In: XVI Reunião anual da federação de sociedades de biologia experimental. Caxambu, Brasil.
- Soares de Moura R, Costa SS, Jansen JM, Silva CA, Lopes CS, Bernardo-Filho M, Nascimento-da-Silva V, Criddle DN, Portela BN, Rubenich LM, Araujo RG, Carvalho LC 2002. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. *J Pharm Pharmacol* 54: 249-256.
- Souza CD, Felfili JM 2006. Uso de plantas medicinais na região de alto paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta Bot Bras* 20: 135-142.
- Souza GS, Castro EM, Pinto JEBP, Alves E, Biagiotti G, Deuner S 2007. Estrutura foliar e de cloroplastídeos de *Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker em diferentes condições de qualidade de luz. *Rev. Bras. de Bioc.* 5: 78-80

- Tavares JP, Martins IL; Vieira AS; Lima FAV; Bezerra FAF; Moraes MO; Moraes MEA 2006. Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico a base de associações de plantas, mel e própolis. *Rev Bras Farmacogn* 16: 350-356.
- Taufner CF, Ferraço EB, Ribeiro LF 2006. Uso de plantas medicinais como alternativa fitoterápica nas unidades de saúde pública de Santa Teresa e Marilândia, ES. *Natureza online* 4: 30-39.
- Vaz APA, Scaranari C, Batista LAR, Figueira GM, Sartoratto A, Magalhães PM 2006. Biomassa e composição química de genótipos melhorados de espécies medicinais cultivadas em quatro municípios paulistas. *Pesq Agrop Bras* 41: 869-872.
- Vendruscolo GS, Mentz LA 2006. Estudo da concordância das citações de uso e importância das espécies e famílias utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, RS, Brasil. *Acta Bot Bras* 20: 367-382.
- Veneziani RCS, Camilo D, Oliveira R 1999. Constituents of *Mikania glomerata* Sprengel. *Biochem Syst Ecol* 27: 99-102.
- Vicentino ARR, Menezes FS 2007. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. *Rev Bras Farmacogn* 17: 384-387.
- Vieira SH, Takahashi JA, Oliveira AB, Chiari E, Boaventura MA 2002. Novel derivatives of kaurenoic acid: Preparation and evaluation of their Trypanocidal activity. *J. Braz. Chem. Soc* 13: 151-157.
- Vilegas JHY, Marchi E, Lanças FM 1997. Extraction of low-polarity compounds (with emphasis on coumarin and kaurenoic acid) from *Mikania glomerata* ("guaco") leaves. *Phytochem Anal* 8: 266-270.

- Vlietinck AJ, De Bruyne T, Apers S, Pieters LA 1998. Plant derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta Med.* 64: 97-109.
- Wilkens M, Alarcon C, Urzua A, Mendoza L 2002. Characterization of the bactericidal activity of the natural diterpene kaurenoic acid. *Planta Med.* 68: 452-454.
- Yatsuda R, Rosalen PL, Cury JA, Murata RM, Rehder VLG, Melo LV, Koo H 2005. Effects of *Mikania genus* plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. *J Ethnopharmacol* 97: 183-189.

Tabela 1. Estudos agronômicos, genéticos e morfoanatômicos de *Mikania glomerata* e *M. laevigata*.

Estudos	Resultados		Referências
	<i>Mikania glomerata</i> Spreng.	<i>Mikania laevigata</i> Schultz Bip ex Baker	
Agronômicos	Florescimento de agosto a dezembro Intolerante ao frio no cultivo em campo	Florescimento de agosto a novembro Tolerante ao frio no cultivo em campo	Lima et al., 2003a; Ritter, Miotto, 2005.
	Desenvolve melhor em baixo nível de sombreamento; plantas jovens (até 100 dias de idade) cultivadas à luz solar produz duas vezes mais cumarinas que plantas adultas no mesmo período; o fotoperíodo influenciou positivamente as características associadas ao crescimento, anatomia foliar e fotossintética.	O uso de sombrites coloridos promovem alterações morfológicas, anatômicas e ultra-estruturais; apresenta uma grande plasticidade fenotípica em função dos tratamentos de qualidades de luz	Castro, 2002; Castro et al., 2003; Castro et al., 2006; Souza et al., 2007.
	Altitude e os meses de janeiro e fevereiro apresentam melhores rendimentos de cumarina; extratos de folhas jovens coletadas em dezembro e julho contém maior teor de cumarina	-	Cabral et al., 2001; Pereira et al., 2000.
	A planta propagada por estaca produziu cumarina e ácido caurenóico, enquanto que o material micropropagado acumulou somente cumarina	-	Contini et al., 2006.
	-	Inibição da germinação de sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i>) observada em extratos obtidos através do cultivo hidropônico e tradicional	Baratto et al., 2008.
	A produção de biomassa varia qualitativamente e quantitativamente em função dos locais de cultivo.	-	Vaz et al., 2006.
	Forno de circulação de ar demonstrou ser o mais apropriado processo de secagem para obtenção máxima de cumarinas	-	Pereira et al., 2000.
	O enraizamento em estaquias semilenhosa não depende da aplicação do regulador vegetal naftalenoacético; melhor enraizamento com substrato de casca de arroz carbonizada; enraizamento não é influenciado por diferentes sistemas de irrigação; volume maior de massa seca sob rega manual; área foliar recomendada de 100 cm ² , resposta frente a aplicação exógena de bioreguladores no desenvolvimento da planta.	Melhor enraizamento com substrato de casca de arroz carbonizada; enraizamento não é influenciado por diferentes sistemas de irrigação; volume maior de massa seca sob rega manual; <i>M. laevigata</i> apresentou maior tolerância ao frio que <i>M. glomerata</i> ; Área foliar recomendada de 100 cm ²	Colodi et al., 2008; Lima; Biasi, 2002; Lima et al., 2003b; Capaldi, 2007.
	Aumento da concentração de cumarina com o uso de fertilizantes orgânicos; maior aumento da fitomassa em caules que em folhas com o uso de fertilizantes inorgânicos	-	Pereira et al., 1998.

Genéticos	Análise cromossômica 2n = 36	Análise cromossômica 2n = 38	Lima et al., 2003a.
Morfológicos	Folhas com consistência subcoriácea	Folha com consistência coriácea, escuras quando secas	Oliveira et al., 1986a, b; F. Bras. IV, 2005.
	Nervuras da folha tri ou pentanervadas na base	Trinervadas na base, com nervuras impressas na face ventral e salientes na face dorsal	Oliveira et al., 1985a; 1986a; 1994.
	Folhas opostas, de formato cordiforme a deltóide, ápice de acuminado a agudo, base cordata a obtusa e margem levemente ondulada.	-	Milan, Hayashi, Appezato-da-Glória, 2006.
	Folhas opostas, de base obtusa, formato quase deltóide, de cor verde-escura, semitorcidas, carnosos-coriáceas e com três nervuras conspicuas	-	Lorenzi, Matos, 2008.
	A folha tem medidas de comprimento e largura muito próximos, a base é hastada e os dentes laterais são muito evidentes	Folha de maior comprimento que largura, base não hastada e dentes laterais, quando presentes, pouco evidentes	F. Bras. IV, 2005.
	Folhas opostas, ovaladas a lanceolado-hastadas, 6-24 x 4-11 cm, base cordada a atenuada.	Folhas opostas, ovalado-lanceoladas, 6,5-15 x 3-5,5 cm, base atenuada.	Ritter, Miotto, 2005.
	Capítulos sésseis dispostos em panículas de glomérulos densos.	Capítulos sésseis dispostos em panículas de glomérulos densos e glabros	
	Brácteas subinvolucrais ovaladas, junto às brácteas involucrais, 1-2 x 0,7 mm, glabrescente.	Brácteas subinvolucrais estreitamente ovaladas, junto às brácteas involucrais, 1-2 x 0,5 mm, glabra a pouco pilosa	
	Brácteas involucrais oblongas, base alargada, margem inteira, ápice agudo a obtuso às vezes ciliado, glabras a pouco pilosas	Brácteas involucrais estreitamente oblongas, base alargada, margem inteira, ápice obtuso às vezes ciliado, glabras a pouco pilosas	

Anatômicos	Em vista frontal, as células apresentam contorno levemente sinuoso, sendo mais evidente na face abaxial. As células da face abaxial mostram-se menores que as da superfície adaxial. Estômatos anomocíticos. O mesofilo é dorsiventral, entretanto, pode variar de acordo com a região da folha. No terço médio inferior da folha, na face adaxial, encontra-se uma camada de hipoderme com células maiores que as da camada epidérmica. A nervura central apresenta duas a quatro camadas contínuas de colênquima. 3 feixes vasculares colaterais estão mergulhados no parênquima fundamental. Próximos aos feixes vasculares são encontrados dutos secretores	Em vista frontal, as células apresentam contorno muito sinuoso e as paredes mostram-se espessas, sendo que as células tornam-se mais alongadas próximas à nervura principal. A cutícula mostra-se delgada e lisa. Estômatos anomocíticos e anisocíticos. O mesofilo é dorsiventral. A nervura central é biconvexa. O colênquima angular ocorre abaixo da epiderme e aparece em maior número na face adaxial. 3-8 feixes colaterais, formando um semi-círculo, estão localizados no parênquima fundamental. Junto aos feixes vasculares, na região voltada para a face adaxial, ocorrem dutos secretores	F. Bras. IV, 2005; Milan, Hayashi, Appezato-da-Glória, 2006.
	As células de epiderme superior apresentam contornos, aproximadamente, retangulares alongadas no sentido tangencial e mostram-se maiores que as da face abaxial. Abaixo da epiderme adaxial observa-se a presença de camada celular não clorofilada, a medida que se afasta da região da nervura principal a camada celular apresenta células menores podendo inclusive faltar	As células da epiderme superior apresentam tamanho variado, quase sempre de contorno retangular, alongado periclinamente. Logo abaixo da epiderme, nota-se outra camada celular não clorofilada com células de tamanho maior que as da camada epidérmica. Na região da nervura central e no bordo foliar a epiderme é sempre uniestratificada	Oliveira et al., 1986a; Neves e Sá, 1991; Oliveira et al., 1994; F. Bras. IV, 2005.
	Uma fileira celular em paliçada na região da nervura central	Um clorênquima descontínuo e voltado para a face adaxial aparece na nervura central	Oliveira et al., 1986a.; F. Bras. IV, 2005.
	Parênquima paliçádico constituído por duas camadas de células com formas características de H, Y ou V	Parênquima paliçádico formado por 1-4 estratos de células cujo comprimento não ultrapassa três vezes a largura. O parênquima esponjoso é formado por 7-12 de células braciiformes	Oliveira et al., 1994; F. Bras. IV, 2005.
	Tricomas simples curvos	Tricomas simples curvos, podendo ocorrer isolados ou geminados em ambas as superfícies	Oliveira et al., 1986a, 1994; Neves; Sá, 1991; F. Bras. IV, 2005.
	Tricoma glandular peltado e tricoma glandular unisseriado, com variável número de células na base e com célula terminal esférica ou espatulada são encontrados em depressão na epiderme, sendo este em maior frequência.	Presença de tricomas glandulares capitados com cabeça secretora globosa, formada por células dispostas em uma ou duas séries, ocorrendo em acentuada depressão.	F. Bras. IV, 2005; Milan et al., 2006.

Tabela 2. Estudos químicos de *Mikania glomerata* e *M. laevigata*.

<i>Mikania glomerata</i> Spreng.		<i>Mikania laevigata</i> Schultz Bip ex Baker	
Resultados	Referências	Resultados	Referências
Cumarina e derivados Cumarina; dihidrocurmarina; ácido <i>o</i> -cumárico	Lucas, 1942; Oliveira et al., 1984, 1985a, 1993, 1994; Vilegas et al., 1997; Veneziani; Oliveira, 1999; Fierro et al., 1999; Magalhães, 2000; Franchi, 2000; Cabral et al., 2001; Moura et al., 2002; Lima; Biasi, 2002; Castro, 2002; Yatsuda et al., 2005, Santos et al., 2006; Costa et al., 2008; Silva et al., 2008.	Cumarina; diidrocurmarina; ácido <i>o</i> -cumárico	Oliveira et al., 1984, 1994; Bigueti, 1999; Magalhães, 2000; Lima; Biasi, 2002; Biavatti et al., 2004; Bighetti et al., 2005; Yatsuda et al., 2005; Santos et al., 2006; Graça et al., 2007b.
Álcool, Ácidos e ésteres Diterpênicos Ác. Caurenóico; ác. cinamoilgrandiflórico; ácido grandiflórico (ácido 15 α -hidroxi-ent-caur-16-en-19-oic); isômeros de metil ester de ácido caurenóico; ácido <i>ent</i> -beyer-15(16)-en-19-oic; ácido <i>ent</i> -15 β -benzoiloxicaur-16(17)-en-19-oic; ácido 17-hidroxi- <i>ent</i> -caur-15(16)-en 19-oic; ácido <i>ent</i> -15 β - isobutiriloxicaur-16(17)-en-19-oic; ácido isopropiloxi-grandiflórico; ácido diterpênico; ester diterpênico; caurenol	Oliveira et al., 1984, 1985a, 1993, 1994; 1999; Vilegas et al., 1997; Veneziani; Oliveira, 1999; Fierro et al., 1999; Moura et al., 2002; Amaral et al., 2003; Yatsuda et al., 2005.	Ácido caurenóico; caurenol;ác. cinamoilgrandiflórico; ác. cupressênico; ác. isopropiloxi-grandiflórico; ác. isobutiloxi-grandiflórico	Oliveira et al., 1984, 1985a, 1994; Yatsuda et al., 2005.
Heterosídeos Antociânicos	Neves; Sá, 1991.	-	-
Terpenos Sesquiterpenos – espatulenol; EPI-biciclosesquifelandrêno; <i>trans</i> -cariofileno; germacrenos e outros Triterpenos – Friedelina; Lupeol; acetato de lupeol	Vilegas et al., 1997; Yatsuda et al., 2005. Vilegas et al., 1997; Veneziai; Oliveira, 1999; Lima; Biasi, 2002; Amaral et al., 2003.	Sesquiterpenos – espatulenol; óxido de cariofileno e outros Esteróides/triterpenóides;	Yatsuda et al., 2005. Lima; Biasi; 2002.

Ácidos, aldeídos e esteres orgânicos Ácido palmítico; etil-hexadecanoato; fitol; etil linoleato; Ácido <i>trans</i> -o-hidroxicinâmico; ácido hexadecanóico; ácido 8,11-octadecadienóico; ácido octadecanóico; ácido 9,12,15-octadecatrienóico; ácido 9,12-octadecadienóico; ácido 10,13-octadecadienóico; 1-etoxi-1-feniletanol; 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído; ácido 2-acetil-trans-cinâmico; siringaldeído	Veneziani; Oliveira, 1999; Fierro et al., 1999; Franchi, 2000; Moura et al., 2002; Amaral et al., 2003; Yatsuda et al., 2005.	Ácido hexadecanóico; ácido 9,12,15-octadecatrienóico; ácido 9,12-octadecadienóico; 1-octadeceno; 2,5-ciclohexadieno-1,4-diona, 2,6-bis; siringaldeído	Yatsuda et al., 2005; Pedroso et al., 2008.
Óleo essencial <i>dl</i> -limoneno; α -elemeno; α -copaeno; β -elemeno; δ -elemeno; <i>trans</i> -cariofileno; α -humuleno; germacreno-D; biciclogermacreno; δ -cadineno; elemol; germacreno-B; espatulenol; óxido de cariofileno; EPI- α -muurolol; α -cadinol; α -pineno; β -pineno; mirceno; <i>trans</i> -o-cimeno; linalol; terpin-4-ol; α -terpineol; α -cubebeno; β -bourboneno; β -cubebeno; β -cariofileno; cumarina; aromadendreno; β -farneseno; germacreno-A; γ -cadineno; nerolidol-E; globulol; veridiflorol; vidrol; α -acorenol; TAU-cadinol; sabineno; silvestreno; terpin-4-ol; nonanal; <i>e</i> -nerolidol; globulol; epi- α -bisabolol; diterpenos	Radunz, 2004; Duarte et al., 2005; Rehder et al., 2006.	Sabineno; α -pineno; β -pineno; mirceno; p-cimeno; silvestreno; e- β -ocimeno; terpin-4-ol; nonanal; 1,4-dimetoxibenzeno; cumarina; α -elemeno; α -copaeno; β -elemeno; β -cariofileno; γ -elemeno; aromadendreno; α -humuleno; germacreno-D; biciclogermacreno; elemol; germacreno-B; <i>e</i> -nerolidol; espatulenol; globulol; óxido de cariofileno; epi- α -muurolol; α -cadinol; diterpenos	Rehder et al., 2006.
-	-	Amino grupos	Lima; Biasi, 2002.
Saponinas	Lucas, 1942; Oliveira et al., 1984; Lima; Biasi, 2002.	Saponinas	Oliveira et al., 1984; Lima; Biasi, 2002.
Taninos	Lucas, 1942; Neves; Sá, 1991.	Taninos	Lima; Biasi, 2002.
-	-	Presença de peróxidos nos extratos clorofórmico e diclorometanólicos	Schenkel et al., 2002.
Esteróides Campesterol; estigmasterol; β -sitosterol	Oliveira et al., 1984, 1993, 1994; Santos et al., 1999; Veneziani; Oliveira, 1999; Amaral et al., 2003.	Estigmasterol	Oliveira et al., 1984, 1994.
Minerais Cobre; ferro; zinco	Andrade et al., 2005.	-	-

Tabela 3. Atividades farmacológica de *Mikania glomerata* e *M. laevigata*.

	<i>Mikania glomerata</i> Spreng.			<i>Mikania laevigata</i> Schultz Bip ex Baker		
	Processo extrativo	Resultado	Referências	Processo extrativo	Resultado	Referências
Analgésica	Infusão 10%	Atividade testada através de número de contorções	Ruppelt et al., 1991.	-	-	-
Antialérgica	Extrato etanólico	Inibição de inflamação imunológica	Fierro et al., 1999.	Extrato alcoólico	Efeito anti-inflamatório modelo de pneumonite alérgica	Santos et al., 2006.
Antiasmática	-	-	-	Extrato hidroalcoólico	Mudanças na mobilização do cálcio intracelular	Graça et al., 2007b.
Antibacteriana <i>aphylococcus aureus</i>	Extrato metanólico 70%	Fraca	Betoni et al., 2006.	Extrato etanólico	Inativo	Baratto et al., 2008.
	Extrato hidroalcoólico	Fraca	Holetz et al., 2002; Pessini et al., 2003.			
	Extrato hexânico bruto	Alta	Amaral et al., 2003.	Extrato Hidroalcoólico 70%	Forte	Duarte et al., 2004.
	Extrato metanólico	Inativo				
	Extrato diclorometânico	Inativo				
<i>Escherichia coli</i>	Extrato hidroalcoólico	Fraca	Holetz et al., 2002; Pessini et al., 2003.	Extrato etanólico	Inativo	Baratto et al., 2008.
	Óleo essencial	Inativo	Duarte et al., 2007.	Óleo essencial	Fraco a moderado	Duarte et al., 2007.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Extrato hidroalcoólico	Inativo	Holetz et al., 2002; Pessini et al., 2003.	Extrato etanólico	Inativo	Baratto et al., 2008.
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	Extrato etanólico	Inativo	Baratto et al., 2008.
<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	-	Extrato etanólico	Inativo	Baratto et al., 2008.
<i>Streptococcus mutans</i>	Extrato etanólico	Moderado	Yatsuda et al., 2005.	Extrato etanólico	Moderado	Yatsuda et al., 2005.
	Fração hexânica	Forte		Fração hexânica	Forte	
<i>Bacillus subtilis</i>	Extrato hidroalcoólico	Moderado	Holetz et al., 2002; Pessini et al., 2003.	Extrato hidroalcoólico 70%	Forte	Duarte et al., 2004.
<i>Streptococcus Faecium</i>	Extrato hidroalcoólico 70%	Forte	Duarte et al., 2004.	Extrato hidroalcoólico 70%	Forte	Duarte et al., 2004.

Antidiarréica	Extrato aquoso	Diminuição de trânsito intestinal induzido por loperamida	Salgado et al., 2005.	-	-	-
Anti-inflamatória	Extrato fluido	Atividade antiedematogênica	Oliveira et al., 1985b.	Extrato fluido	Atividade antiedematogênica	Oliveira et al., 1985b.
	Extrato etanólico	Diminuição da exsudação e inibição da diapedese	Fierro et al., 1999.	Decocção de folhas	Alta atividade antiedematogênica; Inibição da diapedese	Suynega, 2002.
	Fração de diclorometano a partir de extrato hidroalcoólico	Atividade Antiedematogênica em patas de camundogos	Moura et al., 2002.	Decocção do caule	Baixa atividade antiedematogênica	Suynega, 2002.
	Extrato hidroalcoólico	Prevenção da lesão pulmonar induzida por poeira de carvão	Freitas et al., 2008.	Extrato hidroalcoólico	Prevenção da lesão pulmonar induzida por poeira de carvão	Freitas et al., 2008.
	Infusão 10%	Atividade antiinflamatória (Difusão de azul de Evans na cavidade intraperitonal de ratos)	Ruppelt et al., 1991.			
Antifúngica	Extrato hidroalcoólico	Inativa	Pessini et al., 2003.	Extrato etanólico	Inativo	Duarte et al., 2005.
<i>Candida albicans</i>	Extrato etanólico	Inativo	Holetz et al., 2002.			
	Óleo essencial	Forte	Duarte et al., 2005.			
<i>Candida parapsilosis</i>	Extrato hidroalcoólico	Inativa	Holetz et al., 2002; Pessini et al., 2003.	-	-	-
<i>Candida crusei</i>	Extrato hidroalcoólico	Fraca	Holetz et al., 2002; Pessini et al., 2003.	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	Extrato hidroalcoólico	Fraca	Holetz et al., 2002; Pessini et al., 2003.	-	-	-

Antiofídica	Extrato aquoso	Inibição de veneno	Pereira et al., 1994; Maiorano et al., 2005.	-	-	-
Antioxidante	Tintura	Inativo	Vicentino; Menezes, 2007.	-	-	-
Antiulcerogênica	-	-	-	Extrato hidroetanólico	Controle da secreção mediada pelo sistema parasintético	Bighetti, 2002; Bigueti et al., 2005 Carvalho, 2006.
Atividade IMAO	Extrato hexânico	Atividade frente a MAO-B inativo frente a MAO-A	Amaral et al., 2003.	-	-	-
	Extrato diclorometano	Atividade frente a MAO-B inativo frente a MAO-A		-	-	-
	Extrato metanólico	Atividade de inibição não seletiva em MAO A e MAO-B		-	-	-
Perfil de ácidos graxos em amostras de pulmão e fígado de camundongos	-	-	-	Extrato aquoso e hidroalcoólico	Influência no perfil de ácidos graxos	Pedroso et al., 2008.
Broncodilatadora	Extrato aquoso, hidroalcoólico e fração diclorometano do extrato hidroalcoólico	Ativo	Moura et al., 2002.	Extrato hidroalcoólico	Ativo	Graça et al., 2007b.
Relaxante muscular lisa	Fração de diclorometano partir de extrato hidroalcoólico	Pequeno efeito vasodilatador sobre o leito vascular mesentérico	Leite et al., 1993; Moura et al., 2002.	-	-	-

ANEXO 2

TABELA 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS A DIVERSOS TIPOS DE AMOSTRAS DE *MIKANIA GLOMERATA* E *M. LAEVIGATA* (continua)

Resultados							
Tipo de amostra	Espécie medicinal	Preparo da amostra	Método utilizado	Condições de análise	Compostos analisados	Teores encontrados	Referências
Xarope de guaco	<i>M. glomerata</i>	Extração através do uso de clorofórmio	Espectrofotometria UV-VIS	Comprimento de onda: 320 nm Branco: Clorofórmio	Cumarina	Média de 74,2 µg mL ⁻¹ de xarope	(SILVA <i>et al.</i> , 2008)
Xarope de guaco	<i>M. glomerata</i>	Extração com duas porções de diclorometano, evaporação sob vácuo e reconstituição em metanol	CLAE	Coluna: C18 250 X 40 mm, 5 µm Fase móvel: acetonitrila: água 30:70 v/v em 0,05% trifluoroacético Tempo: 20 min Fluxo: 1 mL min ⁻¹ Detector UV: 280 nm	Cumarina	Xarope feito a quente: 51,4 µg mL ⁻¹	(ROCHA <i>et al.</i> , 2008)
						Xarope feito a frio: 26,1 µg mL ⁻¹	
Xarope de guaco	<i>M. glomerata</i>	Extração de 10g da amostra em 20 mL de acetato de etila sob agitação por 30 minutos	CG-DIC	Detector: Ionização de chama Capilar: 30m X 0,3mm x 0,25µm (5% fenil 1% metil vinil silicone) Volume de injeção: 1 µL Temperatura do injetor: 250°C Temperatura do detector: 270°C Temperatura da coluna: 100 -250 °C; Gás: hidrogênio Fluxo: 1,8 mL min ⁻¹	Cumarina	143 µg mL ⁻¹	(BUENO; BASTOS, 2009)

TABELA 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS A DIVERSOS TIPOS DE AMOSTRAS DE *MIKANIA GLOMERATA* E *M. LAEVIGATA* (continuação)

Extrato aquoso	<i>M. glomerata</i>	Extração de folhas, raízes e caule em água fervente e maceração por 24 horas. Em seguida, os extratos foram liofilizados.	CCD	Fase estacionária: Silica gel 60 Fase móvel: n-butanol/ác. acético/água (4:1:5 v/v) Detecção: UV a 254 e 366 nm em vanilina ou NP-PEG	Cumarinas e compostos não polares	Análise qualitativa	(MAIORANO <i>et al.</i> , 2005)
			CLAE	Coluna: Supelcosil C18 250 x 4,6 mm 5 µm Fase móvel: Gradiente metanol/água /0,1% de ácido acético 10-100% metanol durante 50 minutos Comprimento de onda: 210, 280 e 340 nm			
Extrato aquoso	<i>M. glomerata</i> e <i>M. laevigata</i>	Infusão 1% m/v de folha seca.	CLAE	Coluna: Nova-Pak C18 150 x 3,9 mm 4 µm Fase móvel: Acetonitrila/água/0,01% ácido acético (20:80) Fluxo: 1,2 mL min ⁻¹ Temperatura: 30 °C Comprimento de onda: 275 nm	Cumarina	20,66 a 45,00 µg mL ⁻¹	(SANTOS, 2005)
					Ácido <i>o</i> -cumárico	13,00 a 35,00 µg mL ⁻¹	
Extrato aquoso	<i>M. glomerata</i>	Planta fresca: Água (Refluxo e temperatura ambiente).	CLAE	Coluna: Chromosorb C18 250 x 4,6 mm 10 µm Fase móvel: Metanol/água (1:1 v/v) Fluxo: 0,5 mL min ⁻¹ Temperatura: Não especificada Comprimento de onda: 220 nm	Cumarina	2,30% em refluxo; 1,69% em temperatura ambiente	(CABRAL; DOS SANTOS; ALHAIQUE, 2001)
		Planta fresca: Solução aquosa de NaOH 1,0% m/v (Refluxo e temperatura ambiente).				2,40% em refluxo; 2,00% em temperatura ambiente	

TABELA 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS A DIVERSOS TIPOS DE AMOSTRAS DE *MIKANIA GLOMERATA* E *M. LAEVIGATA* (continuação)

Extrato aquoso	<i>M.glomerata</i>	Infusão em água destilada	CLAE	Coluna: C18 250 X 4mm, 5 µm Temperatura: 30 °C Fase móvel: acetonitrila/água 40:60 v/v modo isocrático Fluxo: 1 mL min ⁻¹ Detecção: UV 274 nm	Cumarina	393,8 µg mL ⁻¹	(CELEGHINI; VILEGAS; LANCAS, 2001)
Extrato aquoso	<i>M.laevigata</i>	Decocção por 5 min	CLAE	Fase móvel: metanol/água 30:70 (ambos acidificados com 2% de ácido fórmico) Modo isocrático Fluxo: 1,5 mL min ⁻¹ Temperatura de forno: 35°C Comprimento de onda: 300 nm Coluna: C18 250 X 4,6 mm	Cumarina Ácido <i>o</i> -cumárico Siringaldeído	29,9 µg mL ⁻¹ 15,0 µg mL ⁻¹ 1,50 µg mL ⁻¹	(MUCENEEKI <i>et al.</i> , 2009)
Extrato aquoso		Microondas por 1 min com uso de água mineral			Cumarina Ácido <i>o</i> -cumárico Siringaldeído	27,5 µg mL ⁻¹ 14,0 µg mL ⁻¹ 1,40 µg mL ⁻¹	
Extrato hidroalcoólico		Percolação com etanol:água 1:2 v/v			Cumarina Ácido <i>o</i> -cumárico Siringaldeído	13,0 µg mL ⁻¹ 8,60 µg mL ⁻¹ 1,30 µg mL ⁻¹	
Extrato hidroalcoólico		Estudo de produtos de degradação através do uso de HCL 1M, NaOH 1M, água em pH neutro, H2O2 1% v/v e temperatura (60°C)			Cumarina (Teste de estabilidade) Ácido <i>o</i> -cumárico (teste de estabilidade) Siringaldeído (teste de estabilidade)	Estável nas condições testadas 100% de degradado em meio ácido e boa estabilidade nos demais meios 100% degradado em H2O2 e 51,7% em temperatura	

TABELA 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS A DIVERSOS TIPOS DE AMOSTRAS DE *MIKANIA GLOMERATA* E *M. LAEVIGATA* (continuação)

Extrato hidroalcoólico	<i>M. glomerata</i> e <i>M. laevigata</i>	Percolação após 12 horas de maceração com uma mistura de água destilada e álcool de cereais (2:1 v/v)	CCD	Fase estacionária: Silica gel 60 F254 Fase móvel: Tolueno/ dicloro- metano /acetona (45:25:30 v/v) Revelador: Luz ultravioleta 365 nm antes e após a nebulização com solução de KOH 10%	Cumarina, ác. <i>o</i> - cumárico	Análise Qualitativa	(SANTOS, 2005)
			CLAE	Coluna: Nova-Pak C18 150 x 3,9 mm, 4 µm Fase móvel: Acetonitrila/água 0,01% ácido acético (20:80 v/v) Fluxo: 1,2 mL min ⁻¹ Temperatura: 30 °C Comprimento de onda: 275 nm	Cumarina	Extrato hidroalcoólico: 840 - 1580 µg mL ⁻¹	
					Ác. <i>o</i> -cumárico	Extrato hidroalcoólico: 570 - 1730 µg mL ⁻¹	
Extrato hidroalcoólico	<i>M. glomerata</i> e <i>M. laevigata</i>	Maceração com etanol/água (70:30 v/v) das partes aéreas da planta. Analisados extrato hidroetanólico total e frações hexânicas e acetato de etila deste extrato	CG-EM	Capilar: DB5 25m X 0,2 mm X 0,33 µm Temperatura do injetor: 250°C Temperatura do detector: 300°C Gás: Não especificado Fluxo: Não especificado	Dihidrocumarina, cumarina, espatulenol, ác. hexadecanóico, ác. cupressênico, caurenol, ác. caurenóico, isopropil e isobutiril- grandiflórico, 1-octadeceno, ác 9,12,15- octadecatrienoico, ác. diterpênicos, ác. grandiflórico, isopropil-grandifórico, 9,12-octadecadienoico, óxido de cariofileno, <i>trans</i> -cariofileno, EPI- biciclosesquifelandreno, ác. 8,11- octadecanoico,	Análise qualitativa	(YATSUDA <i>et al.</i> , 2005)

TABELA 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS A DIVERSOS TIPOS DE AMOSTRAS DE *MIKANIA GLOMERATA* E *M. LAEVIGATA* (continuação)

Extrato hidroalcoólico	<i>M. glomerata</i>	Percolação e refluxo a quente em etanol 50% v/v	CLAE	Pré Coluna: Lichrosorb C18 10µm Coluna: Nova Pack 4 µm 150 X 3,9 mm, 10 µm Fase móvel: Metanol/água 47:53 v/v Fluxo: 0,5 mL min ⁻¹ Comprimento de onda: 274 nm	Cumarina	Solução Hidro-etanólica: Percolação 780 µg mL ⁻¹ e refluxo 630 µg mL ⁻¹	(ABOY <i>et al.</i> , 2000)
		Percolação e refluxo a quente em etanol 96% v/v				Solução etanólica: Percolação 720 µg mL ⁻¹ e refluxo 570 µg mL ⁻¹	
Extrato hidroalcoólico	<i>M. laevigata</i>	Percolação (etanol 36, 60 e 70% v/v) e maceração por 7 dias a 50 °C	CLAE	Coluna: Luna (Phenomenex) C18 250 X 4,6 mm, 5 µm Fase móvel: Acetonitrila/água 50:50 v/v Fluxo: 0,5 mL min ⁻¹ Comprimento de onda: 274 nm	Cumarina	1010 a 2450 µg mL ⁻¹	(BIAVATTI <i>et al.</i> , 2004)
Extrato hidroalcoólico	<i>M. glomerata</i>	Maceração com etanol 70%	CG-EM	Capilar: HP5 25m x 0,2mm x 0,33 µm Temperatura do capilar: 60 - 240 °C Temperatura do injetor: 220 °C Temperatura do detector: 250°C Gás: Hélio Fluxo: 1,0 mL min ⁻¹ Ionização: 70 eV	DL-limoneno, α-elemeneno, α-copaeno, β-elemeneno, <i>trans</i> -cariofileno, α-humuleno, germacreno-D, biciclogermacreno, δ-cadineno, elemol, germacreno-B, espatulenol, óxido de cariofileno, EPI-α-muurolol, α-cadinol	Análise qualitativa	(DUARTE <i>et al.</i> , 2005)
Extrato hidroalcoólico	<i>M. laevigata</i>	Extração através de maceração com uma mistura de etanol 33 GL/água (7:3 v/v), após obtenção do extrato, houve partição água/triclorometano (1:5 v/v)	CG-EM	Capilar: DB-225MS 30m x 0,25 mm Gás: Hélio Temperatura do capilar: 50 a 220 °C	Cumarina	3,83%	(GRACA <i>et al.</i> , 2007)

TABELA 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS A DIVERSOS TIPOS DE AMOSTRAS DE *MIKANIA GLOMERATA* E *M. LAEVIGATA* (continuação)

Extrato hidroalcoólico	<i>M. glomerata</i>	Maceração das folhas com etanol e fracionamento do extrato através de partição líquido-líquido com diclorometano.	CG-EM	Condições de análise não especificadas	Cumarina, ácido <i>o</i> -cumárico, dihidrocumarina, ácido palmítico, etilhexadecano-ato, phytol, etil-linole-ato, ácido caurenóico	Análise qualitativa	(FIERRO <i>et al.</i> , 1999)
Extrato hidroalcoólico	<i>M. glomerata</i>	Maceração com etanol:água 1:1 v/v seguida de sonicação à temperatura ambiente por 20 minutos	CLAE	Coluna: C18 250 X 4,5 mm Volume de injeção: 20 µL Fase móvel: acetonitrila/água 40:60 v/v Fluxo: 1 mLmin ⁻¹ Temperatura da coluna: 30 °C	Cumarina	15,23 - 593,78 µg mL ⁻¹ (n=5)	(CELEGHINI, 1999)
		Extrato fluido: Extração com etanol:água 1:1 v/v durante 6 horas seguida de percolação				17,26 – 132,77 µg mL ⁻¹ (n=2)	
Extrato hidroalcoólico	<i>M. laevigata</i>	Maceração das folhas com etanol 70% durante 4 horas em 3 ciclos, e evaporação a 40 °C	Coluna separativa	Tamanho da coluna: 4x80cm Fase móvel: gradiente de hexano e acetato de etila (95:5 v/v). Monitoramento em CCD (Sílica gel 60); detecção das frações com anisaldeído	Cumarina	Análise qualitativa	(BIGHETTI <i>et al.</i> , 2005)
			CG-EM	Capilar: DB5 25m x 0,2mm x 0,33 µm Temperatura do capilar: 110 - 300 °C Temperatura do injetor: 250 °C Temperatura do detector: 280 °C Gás: Hélio Fluxo: 1,0 mL min ⁻¹ Ionização: 70 eV	Cumarinas, terpenos e ácidos orgânicos		

TABELA 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS A DIVERSOS TIPOS DE AMOSTRAS DE *MIKANIA GLOMERATA* E *M. LAEVIGATA* (continuação)

Extrato hidroalcoólico	<i>M. glomerata</i>	Extração com metanol a quente (65 °C). Folhas de guaco picadas transversalmente		CCD	Cromatoplaça: Silica Gel Fase móvel: acetato de etila / hexano (1,5:1 v/v) Revelador: Luz ultravioleta a 254 nm.	Cumarina	Análise qualitativa	(RADUNZ, 2004)
				CLAE	Pré Coluna: NUCLEOSIL 5-Silica 100A-5 micron (30x4mm) Coluna: NUCLEOSIL 5-Silica 100A-5 micron 250 X 4,0 mm Injeção: 20 µL Fase móvel: Acetato de etila/Hexano 3:1 v/v Fluxo: 0,6 mL min ⁻¹ Temperatura da coluna: 30 °C Volume de injeção: 20 µL Comprimento de onda: 274 nm		0,2755 a 0,4736 massa/massa obtidos em diferentes períodos de coleta, e 0,2155 a 0,5164 massa/massa obtidos em função de diferentes temperaturas de secagem	
Extrato hidroalcoólico	<i>M. glomerata</i>	Maceração com etanol durante 15 dias. Em seguida o macerado foi submetido à nova maceração por mais dois dias	Fração de diclorometano	CG-DIC	Detector: Ionização de chama Capilar: 25m X 0,3mm x 0,25µm (5% fenil 1% metil vinil silicone) Volume de injeção: 1 µL Temperatura do injetor: 250 °C Temperatura do detector: 280°C Temperatura da coluna: 140 -280 °C; Gás: hélio Fluxo: 65 cm/s	Cumarina	11,4% massa/massa	(SOARES DE MOURA <i>et al.</i> , 2002)
			Fração aquosa (obtida através da dissolução da fase diclorometano em etanol:água 50%)	CG-EM	Ionização: Impacto de elétron (70 eV) Capilar: 25m X 0,22mm X 0,5 µm (polidimetilsiloxano) Temperatura do injetor: 280°C Temperatura da coluna: 140– 280 °C Gás: Hidrogênio	Ácido <i>o</i> -cumárico, dihidrocumarina, cumarina, 1-Etoxi-1-feniletanol, 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído, ác. hexanóico, etil hexanodecanoato, fitol, hidrocarbonetos insaturados, etil linoleato, caurenol, ácido caurenóico (isômero) e ác. car-16-em-18-oic	Análise qualitativa	

TABELA 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS A DIVERSOS TIPOS DE AMOSTRAS DE *MIKANIA GLOMERATA* E *M. LAEVIGATA* (continuação)

Extrato hidroalcoólico	<i>M. glomerata</i>	Maceração com etanol/água 1:1 v/v à temperatura ambiente por 7 dias	CLAE	Coluna: C18 250 X 4mm, 5 µm Temperatura: 30 °C Fase móvel: Acetonitrila/água 40:60 v/v em modo isocrático Fluxo: 1 mL min ⁻¹ Detecção: UV 274 nm	Cumarina	696,4 µg mL ⁻¹	(CELEGHINI; VILEGAS; LANCAS, 2001)
		Maceração com ultra-som em etanol/água 1:1 v/v à temp. ambiente por 30 min				656,2 µg mL ⁻¹	
		Maceração por 7 dias; extração através de ultrassom com etanol:água 1:1 v/v; infusão com água destilada	CCD	Fase estacionária: sílica gel G60 Fase móvel: Tolueno/éter etílico 1:1 v/v saturado com 10% de ácido acético Revelador: Solução de KOH 5% e luz ultravioleta em 366 nm		Análise qualitativa	
Extrato hidroalcoólico	<i>M. laevigata</i>	Aquecimento sob refluxo de 0,1g de folhas moídas em 25 mL de etanol 80%. O extrato foi diluído para 25 mL em etanol 80%.	CCD	Fase estacionária: sílica gel GF 254 Fase móvel: tolueno / diclorometano/ acetona (45:25:30 v/v/v) Revelador: Solução de KOH 10% e luz ultravioleta em 365 nm	Cumarina	Análise qualitativa	BRASIL, 2005
		Refluxo durante 30 min; 0,1 g da droga seca e moída diluída em 10 mL de etanol 50%. O extrato foi diluído para 25 mL, sendo uma alíquota de 40 µL deste extrato diluído para 760 µL (Metanol/água, 47:53 v/v)	CLAE	Coluna: C18 150 x 3,9 mm, 5 µm Fase móvel: Metanol/água 47:53 v/v Fluxo: 0,5 mLmin ⁻¹ Temperatura: Não especificada Comprimento de onda: 275 nm		Análise quantitativa	
Extrato hidroalcoólico	<i>M. glomerata</i>	Maceração e percolação em etanol/água 1:3 v/v	CG-DIC	Detector: Ionização de chama Capilar: 30m X 0,3mm x 0,25µm (5% fenil 1% metil vinil silicone) Injeção: 1 µL Temperatura do injetor: 250°C Temperatura do detector: 270°C Temperatura da coluna: 100 -250 °C; Gás: hidrogênio Fluxo: 1,8 mL min ⁻¹	Cumarina	1330 µg mL ⁻¹	(BUENO; BASTOS, 2009)

TABELA 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS A DIVERSOS TIPOS DE AMOSTRAS DE *MIKANIA GLOMERATA* E *M. LAEVIGATA* (continuação)

Extrato etanólico	<i>M. glomerata</i>	Planta seca: Etanol (Refluxo e temperatura ambiente)	CLAE	Coluna: Chromosorb C18 250 x 4,6 mm, 10 µm Fase móvel: Metanol/água 1:1 v/v Fluxo: 0,5 mLmin ⁻¹ Temperatura: Não especificada Comprimento de onda: 220 nm	Cumarina	0,03-1,59%	(CABRAL; DOS SANTOS; ALHAIQUE, 2001)
		Planta fresca: Etanol (Refluxo e temperatura ambiente)				1,80-2,70%	
Extrato etanólico	<i>M. glomerata</i> <i>M. laevigata</i>	Extração etanólica através do uso de ultrasom em três ciclos	CLAE	Pré-coluna: LiChrospher C18 4x4mm, 5µm Coluna: LiChrospher 100 C18 125 X 4mm, 5 µm Temperatura: 30 °C Fase móvel: Acetonitrila/água 40:60 v/v em modo isocrático Fluxo: 1 ml min ⁻¹ Detecção: UV 274 nm	Cumarina (CM)	<i>M. glomerata</i> : CM: não detectada; OC: não detectado; AB: 0,14-0,17%; AC: 0,05-0,06%; ACA: 0,65-0,85% <i>M. laevigata</i> : CM: 0,28-0,56%; OC: <0,045%; AB: 0,29-0,41%; AC: 0,17-0,26%; ACA: 0,30-0,48%	(BERTOLUCCI <i>et al.</i> , 2008)
					Ác. o-cumárico (OC)		
					Ác. Cinamoilgrandiflorico (AC)		
					Ác. Benzoilgrandiflorico (AB)		
					Ác. Caurenóico (ACA)		
Extrato fluido e tintura	<i>M. glomerata</i>	Extratos preparados em álcool/água 2:1 v/v, diluídos através de uma mistura de água e 5% de acetato de chumbo. Diluição final em HCl 0,1M	Espectrofotometria derivada de primeira ordem	Técnica: <i>zero-crossing</i> Branco: HCL 0,1M Comprimento de onda: 320 nm	Cumarina	379 µg mL ⁻¹ para extrato fluido e 1100 µg mL ⁻¹ para tintura	(OSORIO, 2004)
Extrato fluido		Extrato obtido através de uma mistura de álcool/água 2:1 v/v	Cromatografia preparativa	Fase móvel: Heptano/acetona 10:3 v/v Fase estacionária: Sílica gel 60 Revelador: Sulfovanílico e KOH 5%	Estudo da interferência dos componentes do extrato fluido na leitura da cumarina através de espectrofotometria derivada de primeira ordem.	Análise qualitativa	

TABELA 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS A DIVERSOS TIPOS DE AMOSTRAS DE *MIKANIA GLOMERATA* E *M. LAEVIGATA* (continuação)

Extrato fluido	<i>M. glomerata</i>	Percolação com etanol 70% de folhas irradiadas pelos raios gamma	CLAE	Coluna: C18 250 X10 mm, 5 µm Fase móvel: gradiente de metanol/acetonitrila/ água Fluxo: 1 mL min ⁻¹ Detector UV: 254 nm Temperatura de forno: não informada	Cumarina Ácido o-cumárico	Aumento da concentração de cumarina e diminuição da concentração de ácido o-cumárico	(PEREGRINO; LEITÃO, 2005)
Tintura		Diluição do extrato fluido com etanol 1:10 v/v					
Extrato fluido	<i>M. glomerata</i>	Fração hexânica; fração clorofórmica; fração em acetato de etila; fração etanólica	CCD	Fase estacionária: sílica gel 60 Fase móvel: benzeno/acetato de etila 19:1 v/v e heptano/acetona 10:3 v/v Revelador: anisaldeído seguido de aquecimento a 105 °C por 10 min e observação em luz ambiente, sulfavanílico e observação em luz ambiente, NaOH 5% e observação em luz ultravioleta a 365 nm	Ác. Caurenóico Cinamoilgrandiflórico Estigmasterol Cumarina	Análise Qualitativa	(OLIVEIRA; SAITO; GARCIA, 1993)
Tintura hidroalcoólica	<i>M. glomerata</i>	Extração hidroalcoólica em diferentes proporções de álcool e água.	CLAE	Coluna: RP C18 250 X 4,0 mm, 5 µm Fase móvel: acetonitrila: água 30:70 v/v em 0,05% de ácido trifluoroacético Fluxo: 1 mL min ⁻¹ Temperatura de coluna: Não informada Detector: 280 nm	Cumarina	150 - 470 µg mL ⁻¹	(ROCHA <i>et al.</i> , 2008)
		Extração hidroalcoólica a 70%: planta fresca, planta seca a temperatura ambiente e planta seca e em estufa				690 µg mL ⁻¹ para extrato obtido a fresco; 690 µg mL ⁻¹ para extrato obtido da planta seca em temperatura ambiente e 900 µg mL ⁻¹ para planta seca em estufa	

TABELA 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS A DIVERSOS TIPOS DE AMOSTRAS DE *MIKANIA GLOMERATA* E *M. LAEVIGATA* (continuação)

Extrato hexânico	<i>M. glomerata</i>	Maceração com hexano à temperatura ambiente durante 7 dias	CG-DIC	Detector: Ionização de chama Capilar: 25 m X 0,53 mm x 5 µm (polimetilsiloxano) Temperatura do injetor: 280 °C Temperatura da coluna: 105-240 °C Gás: hidrogênio Fluxo: 65 cm/s	Cumarina	4400 µg/g de planta seca	(VILEGAS; DEMARCHI; LANCAS, 1997a)
					Ácido caurenóico	2000 µg/g de planta seca	
Extrato hexânico	<i>M. glomerata</i>	Maceração (A), maceração com sonicação (B), soxhlet (C), extração com dióxido de carbono em estado supercrítico (D), extração com hexano em estado supercrítico (E)	CG-DIC	Detector: Ionização de chama Capilar: 25 m X 0,53 mm x 5 µm (polimetilsiloxano) Volume de injeção: 0,4 µL Temperatura do injetor: 280 °C Temperatura da coluna: 105-240 °C Gás: hidrogênio Fluxo: 65 cm/s	Cumarina (em relação à planta seca)	A= 4500 µg/g B= 2500 µg/g g C= 0,0 µg/g D= 300 µg/g E= 5000 µg/g g	(VILEGAS; MARCHI; LANÇAS, 1997b)
					Ácido caurenóico (em relação à planta seca)	A= 1900 µg/g B= 2500 µg/g C= 1900 µg/g D= 0,0 µg/g E= 2000 µg/g	
			CG-EM de alta resolução	Ionização: Impacto de eletron Capilar: 25m X 0,25 mm X 0,3 µm (Metilsilicone) Temperatura do injetor: 280°C Temperatura da coluna: 110– 230 °C Gás: Hidrogênio Fluxo: 38 cm/s	Cumarina, lupeol, ác. caurenóico, acetato de lupeol, germacre- no, sesquiterpenos, diterpeno tipo caurano, ácido 11- metilbutanóico,	Análise qualitativa	

TABELA 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS A DIVERSOS TIPOS DE AMOSTRAS DE *MIKANIA GLOMERATA* E *M. LAEVIGATA* (continuação)

Extrato hexânico	<i>M. glomerata</i>	Extratos hexânicos incorporados a coluna cromatográfica empacotada com sílicagel por via úmida. Foram empregadas diferentes séries eluotrópicas	Ponto de fusão, RNM, CCD, IV, EM	Não informada	Cumarina, ácido caurenóico, ác. cinamoilgrandiflórico e estigmasterol	Análise qualitativa	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1984)
	<i>M. laevigata</i>			Não informada			
Extrato hexânico	<i>M. glomerata</i>	Extrato hexânico obtido através de refluxo e a temperatura ambiente	CLAE	Coluna: Chromosorb C18 250 x 4,6 mm, 10 µm Fase móvel: Metanol/água 1:1 v/v Fluxo: 0,5 mL min ⁻¹ Temperatura de forno: Não especificada Comprimento de onda: 220 nm	Cumarina	0,02-0,07%	(CABRAL; DOS SANTOS; ALHAIQUE, 2001)
Extrato hexânico	<i>M. glomerata</i>	Extração de galhos, ramos e folhas com hexano; ressuspensão com metanol:água 19:1 v/v, seguido de partição com hexano e diclorometano	CCD (algumas confirmações realizadas através de ressonância nuclear magnética, cromatografia gasosa, infravermelho e espectrometria de massas)	Fase estacionária: Silica gel 60 Fase móvel: hexano com aumento gradual de polaridade (etanol e metanol)	Fração hexânica (galhos e ramos): friedelina, en-19-oic acid, <i>ent</i> -beyer-15(16)-en-19-oic acid e <i>ent</i> -15β-benzoil-oxicaur-16(17)-en-19-oic acid; Fração diclorometânica: ácido grandiflórico, hidroxi- <i>ent</i> -caur-15(16)-en 19-oic acid	Análise qualitativa	(VENEZIANI; CAMILO; OLIVEIRA, 1999)
					Fração hexânica (folhas): stigmasterol, β-sitosterol, ent-15β-isobutil-oxicaur-16(17)-en-19-oic acid; Fração diclorometânica: cumarina e ácido <i>o</i> -cumárico		

TABELA 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS A DIVERSOS TIPOS DE AMOSTRAS DE *MIKANIA GLOMERATA* E *M. LAEVIGATA* (continuação)

Extrato hexânico	<i>M. glomerata</i>	Maceração com hexano através de ultra-som, filtração, e eluição com hexano e diclorometano através de coluna contendo sílica gel e carvão ativo	CG-DIC	Capilar: Metilsilicone 30m X 0,25 mm X 0,25 µm Temperatura da coluna: Máx 280 °C Temperatura do detector: 300°C Gás: Hidrogênio Fluxo: 39 cm/s	Cumarinas e ácido caurenóico,	Análise qualitativa	(CONTINI <i>et al.</i> , 2006)
Extrato diclorometânico	<i>M. glomerata</i>	Extração com diclorometano através de ultra-som	CG-DIC	Capilar: HP-50 Fenilmetilsilicone 30m X 0,25 mm de espessura X 0,25 mm de diâmetro interno Volume de injeção: 1 mL Temperatura do injetor: 260°C Temperatura da coluna: 280 °C Temperatura do detector: 300°C Gás: Hidrogênio Fluxo: 39 cm/s	Esteróides campesterol, estigmasterol e β-sitosterol	Análise qualitativa	(SANTOS <i>et al.</i> , 1999)
				Capilar: HP-1 Metilsilicone 30m X 0,25 mm de espessura X 0,25 mm de diâmetro interno Volume de injeção: 1 mL Temperatura da coluna: 105-280 °C Temperatura do detector: 300°C Gás: Hidrogênio Fluxo: 39 cm/s	Cumarina		
Extratos clorofórmicos e diclorometânicos	<i>M. laevigata</i>	Maceração 4-10 horas com clorofórmio ou diclorometano	CCD	Placa de silicagel F254 Fase móvel: dicloro metano ou éter de petróleo: acetato de etila 9:1 v/v Revelador: Luz ultravioleta 254 nm. Peróxidos detectados com reagente de Huber and Frohlke	Peróxidos	Reação positiva fraca (análise qualitativa)	(SCHENKEL <i>et al.</i> , 2002)

TABELA 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS A DIVERSOS TIPOS DE AMOSTRAS DE *MIKANIA GLOMERATA* E *M. LAEVIGATA* (continuação)

Óleo essencial de folhas, inflorescências e sementes	<i>M. glomerata</i> (M.G) e <i>M. laevigata</i> (M.L)	Hidrodestilação através de Clevenger.	CG-EM	Capilar: HP-5 25m X 0,2 mm X 0,33 μ m Temperatura do injetor: 240°C Temperatura da coluna: Máx 240 °C Temperatura de interface: 240°C Gás: Hélio Fluxo: 1.0 mL min ⁻¹	Sabineno; α -pineno; β -pineno; mirceno; p-cimeno; silvestreno; e- β -ocimeno; terpin-4-ol; nonanal; 1,4-dimetoxibenzeno; cumarina; α -elemeno; α -copaeno; β -elemeno; β -cariofileno; γ -elemeno; aromadendreno; α -humuleno; germacreno-D; biciclogermacreno; elemol; germacreno-B; e-nerolidol; espatulenol; globulol; óxido de cariofileno; epi- α -farnesol; α -cadinol; diterpenos	Análise qualitativa	(REHDER; SARTORATTO; RODRIGUES, 2006)
Óleo essencial	<i>M. glomerata</i>	Hidrodestilação através de Clevenger seguida de extração com pentano	CG-EM	Capilar: DB5 30m X 0,25 mm X 0,25 μ m Temperatura do injetor: 220°C Temperatura da coluna: Máx 325 °C Temperatura de interface: 240°C Gás: Hélio Fluxo: 1.8 mL min ⁻¹ Energia de ionização: 70 eV Temperatura do detector (massas): 240°C	α -pineno, β -pineno, mirceno, limoneno, trans-ocimeno, linalol, terpin 4-ol, α -terpinol, Δ -elemeno, α -cubebeno, α -copaeno, β -bourboneno, β -cubebeno, β -elemeno, β -cariofileno, cumarina, aromadendreno, α -humuleno, β -farneseno, germacreno-D; A;B, γ ; Δ cardineno, biciclogermacreno, elemol, nerolidol E, espatulenol, globulol, veridifloral, vidrol, α -acorenol, α e TAU-caudinol e α -muurolol	Análise qualitativa	(RADUNZ, 2004)
			CG-DIC	Gás: Nitrogênio Fluxo: 1.2 mL min ⁻¹ Demais condições: Análogas a CG/MS			

TABELA 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS A DIVERSOS TIPOS DE AMOSTRAS DE *MIKANIA GLOMERATA* E *M. LAEVIGATA* (conclusão)

Planta seca	M. glomerata	Mufla 550 °C por 2 horas acidificada com HCl 2 mol/L	Absorção atômica	Condições de análise não especificada	Cobre (total)		1,75 mg% da erva seca	(ANDRADE; ALVES; TAKASE, 2005)
Extratos obtidos através de cloreto de cálcio 1M; tampão ácido acético: acetato de amônio pH 5 (0,1M e 5%); ácido acético 0,5M; e ácido clorídrico 0,5M)		Ferro (total)			6,82 mg% da erva seca			
		Zinco (total)			3,48 mg% da erva seca			
		Cobre			Cloreto de cálcio 1M	0,83 mg% do extrato		
					Tampão	0,26 mg% do extrato		
					Ac.acético 0,5M	0,18 mg% do extrato		
					HCL 0,5M	0,58 mg% do extrato		
		Ferro			Cloreto de cálcio 1M	2,00 mg% do extrato		
					Tampão	0,54 mg% do extrato		
					Ac.acético 0,5M	0,37 mg% do extrato		
					HCL 0,5M	1,25 mg% do extrato		
		Zinco			Cloreto de cálcio 1M	1,14 mg% do extrato		
Tampão	0,39 mg% do extrato							
Ac.acético 0,5M	0,35 mg% do extrato							
HCL 0,5M	1,06 mg% do extrato							
Resíduo de ignição	M. glomerata	Resíduo obtido através de mufla a 500 °C durante 2 horas e 30 min e tratado com ácido clorídrico, ácido nítrico e água oxigenada	Eletrodo voltimétrico anódico	Eletrodo de mercúrio e platina utilizados como eletrodo de trabalho e referência respectivamente	Cádmio		0,21 mg/kg de planta seca	(MAMANI et al., 2005)
					Chumbo		0,43 mg/kg de planta seca	

Fonte: O autor, 2010.

